



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/29, 39/395, 45/00 // C12N 15/13, C12P 21/02, 21/08, C07K 16/26, 16/28</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/51329</p> <p>(43) 国際公開日 1998年11月19日(19.11.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02116</p> <p>(22) 国際出願日 1998年5月13日(13.05.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/125505 1997年5月15日(15.05.97) JP 特願平9/194445 1997年7月18日(18.07.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 佐藤 功(SATO, Koh)[JP/JP] 恒成利明(TUNENARI, Toshiaki)[JP/JP] 石井公恵(ISHII, Kimie)[JP/JP] 〒412-8543 静岡県御殿場市駒門1丁目135番 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: CACHEXIA REMEDY</p> <p>(54)発明の名称 悪液質治療剤</p> <p>(57) Abstract A cachexia remedy containing an active ingredient comprising a substance inhibiting the binding of a parathyroid hormone-related peptide and a receptor thereof. Examples of the inhibiting substance include antagonists against parathyroid hormone-related peptide receptors, parathyroid hormone-related peptide antibodies, antibody fragments, and modified antibodies.</p>		

(57)要約

副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤。

当該阻害する物質は、副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニスト、副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体、抗体断片、抗体修飾物等である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

## 明 細 書

### 悪液質治療剤

#### 技術分野

本発明は副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein (PTHrP)) とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪液質治療剤に関する。

#### 背景技術

末期癌患者にみられる悪液質は、悪性腫瘍の随伴性症候群の一つであり、食欲不振、体重減少、貧血、水電解質の異常、免疫異常などを主症状とする全身状態の不良をきたす。癌患者にとって、悪液質の発症は、生命を脅かす終末期症状をもたらすのみならず、患者の QOL (Quality of life) を著しく損ない、患者自身はもちろん、家族や周囲の人に強い精神的、身体的、社会的影響を及ぼす。

近年、癌悪液質の原因物質であると考えられていたカケクチンが、腫瘍壊死因子 (TNF) と同一因子であることが明らかになった。その後、インターロイキン 1 (IL-1) や IL-6、LIF、IFN などのサイトカインにも同様の作用が明らかになり、癌悪液質は、複数の因子による複合的に作用する病態であることが明らかになってきた。

ヒト口腔底癌由来 OCC-1 細胞株は、このような癌悪液質に関連する種々の液性因子を産生することが知られており、OCC-1 細胞をヌードマウスに移植すると、悪液質などの諸症状を発症させる (Kajimura N. et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 1996, 38 Suppl. pS48-52、Tanaka R. et al., Jpn. J. Clin. Oncology Apr. 1996, 26 (2) p88-94)。これは、ヌードマウスに移植された OCC-1 細胞株が、増殖と共に種々のサイトカイン (G-CSF、IL-6、LIF、IL-11、PTHrP など) を産生し、これらの因子が複合的に作用して、上記諸症状を発症させると考えられる。

このように、OCC-1 細胞株を移植したヌードマウスの症状は、ヒト末期癌患者の症状ときわめて共通性が高いと考えられる。しかしながら、現在に至るまでこのような悪液質に対する薬剤についての報告は知られていない。

### 発明の開示

本発明は、PTHrP とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、悪液質に対する治療剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、かかる治療剤を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質により、目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤である。

上記悪液質としては癌由来のものが挙げられる。

本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein : PTHrP) とその受容体 (PTHrP 受容体) との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤である。

本明細書中で「PTHrP 受容体」とは、例えば特表平 6-506598 号公報に記載されている PTHrP と結合する受容体を指し、標的器官上 (例えば骨や腎臓) に存在する PTHrP 受容体か否かを問わない。

また、「PTHrP と PTHrP 受容体との結合を阻害する物質」とは、PTHrP に結合することにより、PTHrP が PTHrP 受容体と結合することを阻害する物質 (例えば抗 PTHrP 抗体)、および PTHrP 受容体に結合することにより、PTHrP が PTHrP 受容体と結合することを阻害する物質 (例えば PTHrP 受容体に対するアンタゴニスト (PTHrP アンタゴニストともいう)、具体的には PTHrP ペプチドの少なくとも一つのアミノ酸を置換、欠失したもののや PTHrP ペプチドの部分配列などを指す) のいずれか一方又は両方を指す。

抗 PTHrP 抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体 (W096/33735 号公報) 又はキメラ抗体 (特開平 4-228089 号公報) などの公知の抗体のほか、本発明における抗体 (#23-57-137-1 抗体) などが挙げられる。なお、抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であることが好ましい。また、PTHrP アンタゴニストとしては、ポリペプチドや低分子を含むが、例えば PTHrP に対して拮抗的に PTHrP 受容体に結合す

る物質、例えば特開平 7-165790 号公報、Peptides (UNITED STATES) 1995, 16 (6) 1031-1037、Biochemistry (UNITED STATES) Apr. 28 1992, 31 (16) 4026-4033、特表平 5-509098 号公報に記載の PTHrP アンタゴニスト活性を有するポリペプチドが挙げられる。また、上記例示のポリペプチドのうち、少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換、付加、挿入されたポリペプチドで、同等の PTHrP アンタゴニスト活性を有するものも本発明の PTHrP アンタゴニストに含まれる。

本発明では、「PTHrP と PTHrP 受容体との結合を阻害する物質」として抗 PTHrP 抗体を例に説明する。

## 1. 抗 PTHrP 抗体

本発明で使用される抗 PTHrP 抗体は、悪液質の治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問うものではない。

本発明で使用される抗 PTHrP 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗 PTHrP 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体は PTHrP と結合することにより、PTHrP が PTH/PTHrP 受容体に結合するのを阻害して PTHrP のシグナル伝達を遮断し、PTHrP の生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 により産生される #23-57-137-1 抗体が挙げられる。

なお、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1 として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、平成 8 年 8 月 15 日に、FERM BP-5631 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

## 2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のよ

うにして作製できる。すなわち、PTHrP を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒト PTHrP を、Suva, L. J. et al., Science (1987) 237, 893 に開示された PTHrP 遺伝子／アミノ酸配列を発見することによって得る。すなわち、PTHrP をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的の PTHrP タンパク質を公知の方法で精製する。

次に、この精製 PTHrP タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、PTHrP の N 末端の 34 個のペプチドについて、化学合成により作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4-21 日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology

and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1-10 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な RPMI1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 37℃程度に加温した PEG 溶液 (例えば平均分子量 1000-6000 程度) を通常 30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間 (通常、数日～数週間) 継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングお

よび単一クローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で PTHrP に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、PTHrP への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる PTHrP を投与して抗 PTHrP 抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞から PTHrP に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO 92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

### 3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990 参照）。

具体的には、抗 PTHrP 抗体を産生するハイブリドーマから、抗 PTHrP 抗体の可変 (V) 領域をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により行って全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用して目的の



mRNA を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることにより mRNA を直接調製することができる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNA の合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。

目的とする抗 PTHrP 抗体の V 領域をコードする DNA を得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA を含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗 PTHrP 抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質 (ヤギ  $\beta$  カゼインなど) をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニ

ックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

#### 4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体 V 領域をコードする DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023 号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計した DNA 配列を、CDR 及び FR 両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト型化抗体が得られる (EP 239400 号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

CDR を介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4を、L鎖ではC $\kappa$ 、C $\lambda$ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用できるヒト型化抗体としてはヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。ヒト型化#23-57-137-1抗体は、マウス由来の#23-57-137-1抗体の相補性決定領域を、L鎖についてはヒト抗体HSU03868 (GEN-BANK, Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) 由来の3つのFR断片 (FR1、FR2 および FR3) 並びにヒト抗体 S25755 (NBRF-PDB) 由来のFR断片 (FR4) に連結したものであり、H鎖についてはヒト抗体 S31679 (NBRF-PDB, Cuisinier AMら, Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993) のフレームワーク領域と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

なお、ヒト型化#23-57-137-1抗体のL鎖またはH鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月15日に、H鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌である *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) については FERM BP-5629 として、L鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌である *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq $\lambda$ /pUC19) については FERM BP-5630 として、ブダペスト条約に基づきそれぞれ国際寄託されている。

## 5. 抗体修飾物

本発明で使用する抗体は、PTHrP に結合し、PTHrP の活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv

(scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

scFv は、抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域とを連結することにより得られる。この scFv において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFv における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸 12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFv をコードする DNA は、前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする DNA、および L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする DNA のうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて PCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードする DNA、およびその両端が各々 H 鎖、L 鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせ増幅することにより得られる。

また、一旦 scFv をコードする DNA が作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って scFv を得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗 PTHrP 抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物

も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

#### 6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーシオンファクター 1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合は Mulligan らの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合は Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えば lacz プロモーター、araB プロモーターを挙げるができる。lacz プロモーターを使用する場合は Ward らの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいは araB プロモーターを使用する場合は Better らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、

pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379 ) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものをを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えば CHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa 細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞を in vitro または in vivo で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

## 7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia 製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製すること

ができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

#### 8. 抗体の活性の確認

本発明で使用する抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガンドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用する抗 PTHrP 抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、PTHrP (1-34) をコーティングしたプレートに、抗 PTHrP 抗体を含む試料、例えば、抗 PTHrP 抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル磷酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用する抗体の活性を確認するには、抗 PTHrP 抗体の中和活性を測定する。

#### 9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、悪液質に対する治療又は改善を目的として使用される。また、悪液質の種類は癌由来のものであるか否かを問わない。例えば、癌由来のものとして、J. Urol. (UNITED STATES) Mar 1995, 153 (3 Pt 1) p854-857、Langenbecks Arch. Chir. Suppl II Verh Dtsch Ges Chir (GERMANY) 1990, p261-265、Oncology (SWITZERLAND) 1990, 47 (1) p87-91、Int. J. Pancreatol. (UNITED STATES) Aug-Nov 1990, 7 (1-3) p141-150、J. Natl. Cancer Inst. (UNITED STATES) Dec 19, 1990, 82 (24) p1922-1926 などに記載の悪液質が挙げられる。

また、癌由来でないものとして、JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. (UNITED STATES) Nov-Dec 1990, 14 (6) p605-609、Chest (UNITED STATES) Nov 1990,

98 (5) p1091-1094, Bone Marrow Transplant. (ENGLAND) Jul 1990, 6 (1) p53-57 などに記載の悪液質が挙げられる。

本発明の抗 PTHrP 抗体を有効成分として含有する治療剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には経肺剤型（例えばネフライザーなどの器具を用いた経肺投与剤）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の例としては、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり 0.001mg から 1000mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり 0.01~100000mg/body の投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗 PTHrP 抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与時期としては、悪液質が生ずる前後を問わず投与してもよく、あるいは体重減少が予測される時に投与してもよい。

本発明の抗 PTHrP 抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ（Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として



使用する場合、精製された抗 PTHrP 抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えば Tween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。

あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

#### 図面の簡単な説明

- 図 1 は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 2 は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 3 は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 4 は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 5 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 6 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 7 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 8 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 9 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 10 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 11 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 12 は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。
- 図 13 は、ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。
- 図 14 は、ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。
- 図 15 は、ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。
- 図 16 は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 17 は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 18 は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。
- 図 19 は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、参考例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例等にその技術的範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕悪液質モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍ヌードマウス移植系の悪液質モデル動物を用いて、PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の悪液質に対する治療効果を検討した。

モデル動物としてヒト口腔底癌 OCC-1 (財) 実験動物中央研究所より購入) を移植したヌードマウスを用いた。ヒト口腔底癌 OCC-1 を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの悪液質症状を発症する。ヒト口腔底癌 OCC-1 によって引き起こされる悪液質症状を、マウスモノクローナル抗体が改善することを、血中カルシウム濃度、体重および延命効果を指標にして評価した。

ヒト口腔底癌 OCC-1 の継代は、BALB/c-nu/nu ヌードマウス (日本クレア) を用いて *in vivo* で行った。薬効評価には、6 週齢雄性 BALB/c-nu/nu ヌードマウス (日本クレア) を購入し、1 週間の馴化の後、7 週齢の動物を使用した。

悪液質モデル動物の作製および群分けは、以下のように行った。すなわち、継代しているヒト口腔底癌 OCC-1 を摘出し、3 mm 角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に 1 匹あたり 1 個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、10 日目に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、血中カルシウム濃度、体重および腫瘍体積を指標として各指標が平均化するように群分けし、悪液質モデル動物とした。

悪液質に対する治療効果の検討は、以下のように行った。

(1) 生存期間の観察

延命効果の検討では、マウスモノクローナル抗体を週 2 回投与して、生存期間の観察を行った。また、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているパミドロネート (アレディア) を、15mg/Kg の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) を 0.2ml/mouse で尾静脈内に週 2 回投与した。その結果を図 1 に示す。

(2) 血中カルシウム濃度の観察

上記で作製、群分けした悪液質モデル動物に、マウス1匹あたり  $10\mu\text{g}$  または  $100\mu\text{g}$  の PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体を尾静脈内に2日おきに2回投与した。また、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているパミドロネート（アレディア）を、 $15\text{mg/Kg}$  の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を  $0.2\text{ml/mouse}$  で尾静脈内に2日おきに2回投与した。

### (3) 血中カルシウムの測定

マウスモノクローナル抗体投与後、1日および4日目に血中カルシウム濃度を測定し、各抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643 自動 Ca/pH アナライザー（CIBA-CORNING）を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。体重は、抗体投与後4日目まで毎日測定した。その結果を、図2および図3に示す。

### (4) 腫瘍重量の測定

腫瘍体積は、抗体投与後4日目に、腫瘍の長径（a mm）および短径（b mm）を測定し、ギャランの計算式  $ab^2/2$  により腫瘍体積として算出した。その結果を、図4に示す。

以上の結果より、血中カルシウム濃度については、抗体濃度  $10\mu\text{g}$  では、パミドロネート投与群と差がないにも関わらず、悪性腫瘍に伴う体重減少をパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制した。抗体濃度  $100\mu\text{g}$  を投与した群では、血中カルシウム濃度の上昇をパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制し、体重減少もパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制した。また、抗 PTHrP 中和抗体  $100\mu\text{g}$  を週2回投与した群では、パミドロネート投与群又は対照群に比べて有意な生存期間の延長（ $p=0.0003$  : Log Rank test）が認められた。このことから、PTHrP に対する中和マウスモノクローナル抗体は体重減少抑制、生存期間の延長など既存の高カルシウム血症治療薬にはない効果を有する。したがって本抗体の悪性腫瘍に伴う悪液質の治療薬としての有用性が示された。

## 〔実施例2〕 高カルシウム血症・悪液質モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍-ヌードマウス移植系の悪液質モデル動物を用いて、PTHrP に対するヒト型化抗体バージョン q の悪液質に対する治療効果を検討した。

モデル動物としてヒト口腔底癌 OCC-1（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードマウスを用いた。ヒト口腔底癌 OCC-1 を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの悪液質症状を発症する。ヒト口腔底癌 OCC-1 によって引き起こされる悪液質症状を、ヒト型化抗体バージョン q が改善することを、血中カルシウム濃度、体重および延命効果を指標にして評価した。

ヒト口腔底癌 OCC-1 の継代は、BALB/c-nu/nu ヌードマウス（日本クレア）を用いて *in vivo* で行った。薬効評価には、6 週齢雄性 BALB/c-nu/nu ヌードマウス（日本クレア）を購入し、1 週間の馴化の後、7 週齢の動物を使用した。

悪液質モデル動物の作製および群分けは、以下のように行った。すなわち、継代しているヒト口腔底癌 OCC-1 を摘出し、3 mm 角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に 1 匹あたり 1 個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、10 日目に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、腫瘍体積、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、悪液質モデル動物とした。

悪液質に対する治療効果の検討は、以下のように行った。

#### (1) 生存期間の観察

延命効果の検討では、ヒト型化抗体バージョン q を週 2 回尾静脈内に投与して、生存期間の観察を行った。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を 0.1 ml/mouse で尾静脈内に週 2 回投与した。その結果を図 16 に示す。

#### (2) 血中カルシウム濃度の観察

上記で作製、群分けした悪液質モデル動物に、マウス 1 匹あたり 10  $\mu$ g または 100  $\mu$ g のヒト型化抗体バージョン q を尾静脈内に 2 日あけて 2 回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を 0.1 ml/mouse で同様に投与した。

#### (3) 血中カルシウムの測定

ヒト型化抗体バージョン q 初回投与後、1 日および 4 日目に血中カルシウム濃度を測定し、抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643 自動 Ca/pH アナライザー（CHIRON）を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。体重は、4 日目まで毎日測定した。その結果を、図 17 および図 18 に

示す。

#### (4) 腫瘍重量の測定

腫瘍体積は、初回投与時および4日目に、腫瘍の長径 (a mm) および短径 (b mm) を測定し、ギャランの計算式  $ab^2/2$  により算出した。その結果を図 19 に示す。

以上の結果のように、ヒト型化抗体バージョン q を  $10 \mu\text{g}$  あるいは  $100 \mu\text{g}$  を投与することで、悪性腫瘍に伴う血中カルシウム濃度の上昇及び体重の減少は対照群に比べて抑制された。また、ヒト型化抗体バージョン q を  $100 \mu\text{g}$ 、週 2 回投与し続けた場合、対照群に比べて有意な生存期間の延長 ( $p=0.0108$  : Log Rank test) が認められた。今回のヒト型化抗体バージョン q の悪性腫瘍に伴う悪液質モデル動物に対する効果は、すでに報告したマウスモノクローナル抗体の効果と同様のものであった。このことから、本抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症・悪液質の治療薬としての有用性が示された。

#### [参考例 1]

抗 PTHrP (1-34) マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒト PTHrP (1-34) (配列番号 75) に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #23-57-154 および #23-57-137-1 を、佐藤幹二らにより作製された (Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993)。

免疫原として使用するために、PTHrP (1-34) (Peninsula 製) とキャリアタンパクであるサイログロブリンをカルボジイミド (Dojinn) を用いて結合した。サイログロブリンと結合した PTHrP (1-34) を透析し、タンパク濃度として  $2 \mu\text{g/ml}$  となるように調製した後、フロイントアジュバント (Difco) と 1:1 で混合し、エマルジョン作製後、16 匹の雌性 BALB/C マウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり  $100 \mu\text{g}$  を 11 回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、マウス尾静脈より採血し、血清分離後 RIA バッファーで希釈した抗血清と  $^{125}\text{I}$  標識 PTHrP (1-34) を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアタンパクを結合していない PTHrP (1-34) を動物あたり  $50 \mu\text{g}$  を

最終免疫した。

最終免疫3日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株 P3x63Ag8U.1 を 50%ポリエチレングリコール 4000 を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を  $2 \times 10^4$  /ウェルの細胞数で 85 枚の 96 穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別は HAT 培地を用いて行った。

ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT 培地中で生育の認められた穴の培養上清を固相化 RIA 法にて PTHrP 認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15% FCS を含む RPMI-1640 培地に OPI-supplement (Sigma) を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PTHrP (1-34) との結合能の強いクローン #23-57-154 および #23-57-137-1 を得た。

なお、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1 として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、平成 8 年 8 月 15 日に、FERM BP-5631 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

〔参考例 2〕ヒト PTHrP (1-34) に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする DNA のクローニング

ヒト PTHrP (1-34) に対するマウスモノクローナル抗体 #23-57-137-1 の可変領域をコードする DNA を次の様にしてクローニングした。

(1) mRNA の調製

ハイブリドーマ #23-57-137-1 から mRNA を Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech 社) を用いて調製した。ハイブリドーマ #23-57-137-1 の細胞を Extraction Buffer で完全にホモジナイズし、キット添付の処方に従い、oligo(dT)-Cellulose Spun Column にて mRNA を精製し、エタノール沈殿をおこなった。mRNA 沈殿物を Elution Buffer に溶解した。

(2) マウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の cDNA の作製および増幅

(i) #23-57-137-1 抗体 H 鎖 V 領域 cDNA のクローニング

ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子のクローニングは、5' - RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5' - RACE 法には 5' -Ampli FINDER RACE kit (CLONETECH 社) を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA 合成に使用するプライマーは、マウス H 鎖定常領域 (C 領域) とハイブリダイズする MHC 2 プライマー (配列番号 1) を用いた。前記のようにして調製した mRNA 約 2  $\mu$ g を鋳型として MHC 2 プライマー 10pmole を加え、逆転写酵素と 52°C、30 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

6N NaOH で RNA を加水分解 (65°C、30 分間) した後、エタノール沈殿により cDNA を精製した。T4 RNA リガーゼで 37°C で 6 時間、室温で 16 時間反応することにより、合成した cDNA の 5' 末端に Ampli FINDER Anchor (配列番号 42) を連結した。これを鋳型として PCR により増幅するためのプライマーとして Anchor プライマー (配列番号 2) および MHC - G 1 プライマー (配列番号 3) (S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991) を使用した。

PCR 溶液は、その 50  $\mu$ l 中に 10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 ユニットの TaKaRa Taq (宝酒造)、10pmole のアンカー (Anchor) プライマー、並びに MHC - G 1 プライマー及び Ampli FINDER Anchor を連結した cDNA の反応混合物 1  $\mu$ l を含有する。この溶液に 50  $\mu$ l の鉱油を上層した。PCR は Thermal Cycler Mode 1480J (Perkin Elmer) を用い、94°C にて 45 秒間、60°C にて 45 秒間、72°C にて 2 分間の温度サイクルで 30 回行った。

(ii) #23-57-137-1 抗体 L 鎖 V 領域の cDNA のクローニング

ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子のクローニングは、5' - RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5' - RACE 法には 5' -Ampli Finder RACE Kit (Clonetech) を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA 合成に使用するプライマーは、oligo-dT プライマーを用いた。前記のように調製した mRNA 約 2  $\mu$ g を鋳型と

して oligo-dT プライマーを加え、逆転写酵素と 52℃、30 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。6N NaOH で RNA を加水分解 (65℃、30 分間) した後、エタノール沈殿により cDNA を精製した。合成した cDNA の 5' 末端に前記 Ampli FINDER Anchor を T4 RNA リガーゼで 37℃で 6 時間、室温で 16 時間反応させることにより連結した。

マウス L 鎖  $\lambda$  鎖定常領域の保存配列から PCR プライマー MLC (配列番号 4) を設計し、394 DNA/RNA シンセサイザー (ABI 社) を用いて合成した。PCR 溶液は、その 100  $\mu$ l 中に 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 ユニットの AmpliTaq (PERKIN ELMER)、50pmole の Anchor プライマー (配列番号 2)、並びに MLC (配列番号 4) および Ampli FINDER Anchor を連結した cDNA の反応混合物 1  $\mu$ l を含有する。この溶液に 50  $\mu$ l の鉱油を上層した。PCR は Thermal Cycler Model 480J (Perkin Elmer) を用い、94℃にて 45 秒間、60℃にて 45 秒間、72℃にて 2 分間の温度サイクルで 35 回行った。

### (3) PCR 生成物の精製および断片化

前記のようにして PCR 法により増幅した DNA 断片を 3% Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H 鎖 V 領域として約 550bp 長、L 鎖 V 領域として約 550bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA 溶液 20  $\mu$ l に溶解した。得られた DNA 溶液 1  $\mu$ l を制限酵素 XmaI (New England Biolabs) により 37℃で 1 時間消化し、次いで制限酵素 EcoRI (宝酒造) により 37℃で 1 時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により DNA を回収した。

こうして、5' -末端に EcoRI 認識配列を有し、3' -末端に XmaI 認識配列を有するマウス H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む DNA 断片を得た。

上記のようにして調製したマウス H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む EcoRI-XmaI DNA 断片と EcoRI 及び XmaI で消化することにより調製した pUC19 ベクターを DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16℃



で1時間反応させ連結した。次に  $10\mu\text{l}$  の上記連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン)  $100\mu\text{l}$  に加え、この細胞を氷上で15分間、 $42^{\circ}\text{C}$  にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。次いで  $300\mu\text{l}$  の SOC 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を加え  $37^{\circ}\text{C}$  にて30分間インキュベートした後、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  又は  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリン、 $0.1\text{mM}$  の IPTG、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$  の X-gal を含む LB 寒天培地または  $2\times\text{YT}$  寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 上にこの大腸菌をまき、 $37^{\circ}\text{C}$  にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  又は  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含有する LB 培地または  $2\times\text{YT}$  培地  $2\text{ml}$  で  $37^{\circ}\text{C}$  にて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機 PI-100 $\Sigma$  (クラボウ) 又は QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製し、塩基配列の決定を行った。

#### (4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (ABI 社 Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号5) 及び M13 Primer RV (宝酒造) (配列番号6) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1 に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを MBC1H04、L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを MBC1L24 と命名した。プラスミド MBC1H04 および MBC1L24 に含まれるマウス#23-57-137-1 抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列 (対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号 57、65 に示す。H鎖V領域及びL鎖V領域断片のポリペプチドは、ともに配列番号 57、65 で表される塩基配列の第 58 番目 (グルタミンをコードする) から開始されている。これらのアミノ酸配列を、H鎖V領域の断片については配列番号 46、L鎖V領域の断片については配列番号 45 に示す。

なお、前記プラスミドMBC1H04 およびMBC1L24 を有する大腸菌は *Escherichia coli* JM109 (MBC1H04) および *Escherichia coli* JM109 (MBC1L24) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04) については FERM BP-5628、*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24) については FERM BP-5627 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5) ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1のCDRの決定  
H鎖V領域およびL鎖V領域の全般の構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域（CDR）により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い（Kabat, E. A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983）。このような事実に基づき、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を Kabat らにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示すごとく決定した。

なお、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号 59～61 に示し、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号 62～64 に示した。

表 1				
V領域	配列番号	CDR 1	CDR 2	CDR 3
H鎖V領域	57	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	65	23-34	50-60	93-105

### 〔参考例3〕キメラ抗体の構築

#### (1) キメラ抗体H鎖の構築

##### (i) H鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、クローニングしたマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1-S1

(配列番号7) はV領域のリーダー配列の5' -側をコードする DNA にハイブリダイズし且つ Kozak コンセンサス配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び制限酵素 Hind III の認識配列を有するように設計した。前方プライマー MB C1-a (配列番号8) はJ領域の3' -側をコードする DNA 配列にハイブリダイズし、且つ、スプライドナー配列及び制限酵素 BamHI の認識配列を有するように設計した。PCR は、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、50  $\mu$  l の反応混合液に鋳型 DNA として 0.07  $\mu$  g のプラスミド MBC1H04、プライマーとして MBC1-a および MBC1-S1 をそれぞれ 50 pmole、2.5U の TaKaRa Ex Taq、0.25mM の dNTP 含む条件で添付緩衝液を使用して 50  $\mu$  l の鉱油を上層し、94°C にて1分間、55°C にて1分間、72°C にて2分間の温度サイクルで30回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を3% Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

437bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 20  $\mu$  l に溶解した。得られた DNA 溶液 1  $\mu$  l を制限酵素 BamHI、Hind III (宝酒造) により 37°C 1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により DNA を回収した。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含む Hind III-BamHI DNA 断片を Hind III および BamHI で消化することにより調製した pUC19 ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するためプライマー M13 Primer M4 および M13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1 に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5' -側に Hind III 認識配列及び Kozak 配列、3' -側に BamHI 認識配列を持つプラスミドを MBC1H/pUC19 と命名した。

(ii) cDNA タイプのマウスヒトキメラH鎖の作製のためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1のcDNA と連結するために、上記のようにして構築したマウスH鎖V領域を PCR 法により修飾した。H鎖V領域のための後方プライマー MBC1HVS2 -

(配列番号9)はV領域のリーダー配列の最初をコードする配列の2番のアスパラギンをグリシンに変換し、且つ Kozak コンセンサス配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)並びに Hind III および EcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマー MBC1HVR2 (配列番号 10) はJ領域の3'側をコードする DNA 配列にハイブリダイズし、且つ、C領域の5'側の配列をコードしApa I および SmaI 認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、50 $\mu$ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6 $\mu$ gのプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2 およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taqを2.5U、0.25mMのdNTP含む条件で添付の緩衝液を使用して50 $\mu$ lの鉱油を上層して94 $^{\circ}$ C 1分間、55 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1%Sea Kem GTG アガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 $\mu$ lに溶解した。

得られたDNA溶液1 $\mu$ lを制限酵素EcoRI およびSmaI (宝酒造)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-SmaI DNA断片をEcoRI およびSmaIで消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4及びM13 Primer RVをプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'側にEcoRI およびHind III 認識配列及びKozak 配列、3'側にApa I およびSmaI 認識配列を持つプラスミドをMBC1Hv/pUC19と命名した。

#### (iii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C $\gamma$ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、

ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域IgG1のゲノムDNA (N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクター DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f (W092/19759 参照) と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域およびヒト抗体L鎖 $\kappa$ 鎖C領域のゲノムDNA をコードする発現ベクター RV1-PM1a (W092/19759 参照) とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRVh-PM1f-cDNAと命名した。

DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind III部位、およびEF-1 $\alpha$ プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるEcoRI部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。

pRVh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-BamHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI部位が欠失したDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1-fをHind IIIおよびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1をコードするcDNAを含み、5'-末端にEcoRIおよびHind III認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。

プラスミドMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含むDNA断片を、EcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現ベクターpCOS1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。なお、発現ベクターpCOS1は、HEF-PMh-g $\gamma$

1 (W092/19759 参照) から、EcoRI および SmaI 消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

さらに CHO 細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラスミド MBC1HcDNA/pUC19 を EcoRI および BamHI で消化し、得られたキメラ抗体 H 鎖配列を含む DNA 断片を、EcoRI および BamHI で消化することにより調製した発現プラスミド pCHO1 に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドを MBC1HcDNA/pCHO1 と命名した。なお、発現ベクター pCHO1 は、DHFR-  $\Delta$ E-rvH-PM1-f (W092/19759 参照) から、EcoRI および SmaI 消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

## (2) ヒト L 鎖定常領域の構築

### (i) クローニングベクターの作製

ヒト L 鎖定常領域を含む pUC19 ベクターを構築するために、Hind III 部位欠失 pUC19 ベクターを作製した。pUC19 ベクター 2  $\mu$ g を 20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、100 mM KCl、8 U の Hind III (宝酒造) を含有する反応混合液 20  $\mu$ l 中で 37°C にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNA をエタノール沈殿により回収した。

回収した DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6 U のクレノウ (Klenow) フラグメント (GIBCO BRL) を含有する 50  $\mu$ l の反応混合液中で室温にて 20 分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクター DNA をエタノール沈殿により回収した。

回収したベクター DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM ATP、1mM DTT、5% (v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 U の T4 DNA リガーゼ (GIBCO BRL) を含有する反応混合液 10  $\mu$ l 中で 16°C で 2 時間反応させ、自己連結させた。反応混合液 5  $\mu$ l を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100  $\mu$ l に加え、氷上で 30 分間静置した後、42°C にて 1 分間、さらに氷上で 1 分間静置した。SOC 培地 500  $\mu$ l を加えて、37°C で 1 時間インキュベーションした後、X-gal と IPTG を表面に塗布した 2  $\times$  YT 寒天培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 1989)にまき、37℃で一夜培養して形質転換体を得た。

形質転換体を、50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含有する 2  $\times$  Y T 培地 20ml で 37℃一夜培養し、菌体画分から Plasmid Mini Kit(QIAGEN)を用いて、添付の処方に従ってプラスミド DNA を精製した。精製したプラスミドを Hind III で消化し、Hind III 部位が欠失していることを確認したプラスミドを pUC19  $\Delta$ Hind III と命名した。

(ii) ヒト L 鎖  $\lambda$  鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

ヒト抗体 L 鎖  $\lambda$  鎖 C 領域は、Mc g<sup>+</sup> Ke<sup>+</sup> Oz<sup>-</sup>、Mc g<sup>-</sup> Ke<sup>-</sup> Oz<sup>-</sup>、Mc g<sup>-</sup> Ke<sup>-</sup> Oz<sup>+</sup>、Mc g<sup>-</sup> Ke<sup>+</sup> Oz<sup>-</sup> の少なくとも 4 種類のアイソタイプが知られている (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) 。 #23-57-137-1 マウス L 鎖  $\lambda$  鎖 C 領域と相同性を有するヒト抗体 L 鎖  $\lambda$  鎖 C 領域を EMBL データベースで検索した結果、アイソタイプが Mc g<sup>+</sup> Ke<sup>+</sup> Oz<sup>-</sup> (accession No. X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) のヒト抗体 L 鎖  $\lambda$  鎖が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1 マウス L 鎖  $\lambda$  鎖 C 領域との相同性はアミノ酸配列で 64.4%、塩基配列で 73.4%であった。

そこで、このヒト抗体 L 鎖  $\lambda$  鎖 C 領域をコードする遺伝子の構築を PCR 法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA 合成機 (ABI 社) を用いて行った。HLAMB1 (配列番号 11) および HLAMB3 (配列番号 13) はセンス DNA 配列を有し、HLAMB2 (配列番号 12) および HLAMB4 (配列番号 14) はアンチセンス DNA 配列を有し、それぞれのプライマーの両端に 20 から 23bp の相補的配列を有する。

外部プライマー HLAMBS (配列番号 15)、HLAMBR (配列番号 16) は HLAMB1、HLAMB4 とそれぞれ相同な配列を有しており、また HLAMBS は EcoRI、Hind III、BlnI 認識配列を、HLAMBR は EcoRI 認識配列をそれぞれ含んでいる。第一 PCR で HLAMB1-HLAMB2 と、HLAMB3-HLAMB4 の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二 PCR でアセンブリを行った。さらに外部プライマー HLAMBS および HLAMBR を添加し、第三 PCR により全長 DNA を増幅させた。

PCR は TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を使い、添付の処方に従って行った。第一 PCR では、5 pmole の HLAMB1 および 0.5 pmole の HLAMB2 と 5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する 100  $\mu$ l の反応混合液、あるいは 0.5 pmole の HLAMB3 および 5 pmole

の HLAMB4 と 5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する 100  $\mu$  l の反応混合液を用い、50  $\mu$  l の鉱油を上層して 94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行った。

第二 PCR は、反応液を 50  $\mu$  l ずつ混合し、50  $\mu$  l の鉱油を上層して 94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで3回行った。

第三 PCR は、反応液に外部プライマー HLAMBS および HLAMBR を各 50 pmole ずつ添加し、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

第三 PCR 産物の DNA 断片を 3% 低融点アガロースゲル (NuSieve GTG Agarose, FMC) で電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、添付の処方に従ってゲルから回収、精製した。

得られた DNA 断片を 50 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100 mM NaCl、8 U の EcoRI (宝酒造) を含有する 20  $\mu$  l の反応混合液中で 37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した後、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 8  $\mu$  l に溶解した。

プラスミド pUC19  $\Delta$ Hind III 0.8  $\mu$  g を同様に EcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収した。消化したプラスミド pUC19  $\Delta$ Hind III を 50 mM Tris-HCl (pH9.0)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、アルカリホスファターゼ (E. coli C75, 宝酒造) を含有する反応混合液 50  $\mu$  l 中で 37℃、30 分間反応させ脱リン酸処理 (BAP 処理) した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿により回収した後、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 10  $\mu$  l に溶解した。

上記の BAP 処理したプラスミド pUC19  $\Delta$ Hind III 1  $\mu$  l と先の PCR 産物 4  $\mu$  l を DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を 50  $\mu$  g/ml アンピシリンを含有する 2  $\times$  YT 培地 2 ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

上記プラスミドについて、クローニングされた DNA の塩基配列の確認を行った。塩基配列の決定には 373A DNA シークエンサー (ABI 社) を用い、プライマーには M13 Primer M4 および M13 Pricer RV (宝酒造) を用いた。その結果、クローニングされ



た DNA の内部に 12bp の欠失があることが判明した。この DNA を含むプラスミドを C $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマー HCLMS (配列番号 17)、HCLMR (配列番号 18) を新たに合成し、PCR で再度正しい DNA の構築を行った。

第一 PCR で欠失 DNA を含むプラスミド C $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 を鋳型とし、プライマー HLAMBS と HCLMR、HCLMS と HLAMB4 で反応を行った。PCR 産物をそれぞれ精製し、第二 PCR でアセンブリを行った。さらに外部プライマー HLAMBS および HLAMB4 を添加し、第三 PCR により全長 DNA を増幅させた。

第一 PCR では、鋳型として C $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 0.1  $\mu$ g、プライマー HLAMBS および HCLMR 各 50pmole、あるいは HCLMS および HLAMB4 各 50pmole、5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 100  $\mu$ l の反応混合液を用い、50  $\mu$ l の鉱油を上層して 94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

PCR 産物 HLAMBS-HCLMR(236bp)、HCLMS-HLAMB4(147bp) をそれぞれ 3% 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製した。第二 PCR では精製 DNA 断片各 40ng、1 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 20  $\mu$ l の反応混合液を用い、25  $\mu$ l の鉱油を上層して 94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルを 5 回行った。

第三 PCR では、第二 PCR 反応液 2  $\mu$ l、外部プライマー HLAMBS、HLAMB4 各 50pmole、5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 100  $\mu$ l の反応混合液を用い、50  $\mu$ l の鉱油を上層した。PCR は、94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。第三 PCR 産物である 357bp の DNA 断片を 3% 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製した。

得られた DNA 断片 0.1  $\mu$ g を EcoRI で消化した後、BAP 処理したプラスミド pUC19 $\Delta$ Hind III にサブクローニングした。大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換し、50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含有する 2 $\times$ YT 培地 2ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドについて塩基配列を M13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNA シークエンサー(ABI 社) にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドを C $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 とした。

(iii) ヒトL鎖 $\kappa$ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

プラスミド HEF-PM1k-gk (W092/19759) からL鎖 $\kappa$ 鎖C領域をコードする DNA 断片を PCR 法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA 合成機(ABI 社)を用いて合成した前方プライマー HKAPS (配列番号 19) は EcoRI、Hind III、BlnI 認識配列を、後方プライマー HKAPA (配列番号 20) は EcoRI 認識配列を有するように設計した。

鋳型となるプラスミド HEF-PM1k-gk 0.1  $\mu$ g、プライマー HKAPS、HKAPA 各 50pmole、5 Uの TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する 100  $\mu$ lの反応混合液を用い、50  $\mu$ lの鉱油を上層した。94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の反応を 30 サイクル行った。360bp の PCR 産物を 3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

得られた DNA 断片を EcoRI で消化した後、BAP処理したプラスミド pUC19'  $\Delta$ Hind III にクローニングした。大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換し、50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含有する 2 $\times$ YT培地 2ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドの塩基配列を M13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造)を用い、373A DNA シークエンサー(ABI 社)にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドを C $\kappa$ /pUC19 とした。

(3) キメラ抗体L鎖発現ベクターの構築

キメラ#23-57-137-1 抗体L鎖発現ベクターを構築した。プラスミド C $\lambda$ /pUC19、C $\kappa$ /pUC19 のヒト抗体定常領域の直前にある Hind III、BlnI 部位に、#23-57-137-1 L鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、それぞれキメラ#23-57-137-1 抗体L鎖V領域およびL鎖 $\lambda$ 鎖またはL鎖 $\kappa$ 鎖定常領域をコードする pUC19 ベクターを作製した。EcoRI 消化によってキメラ抗体L鎖遺伝子を切り出し、HEF発現ベクターへサブクローニングを行った。

すなわち、プラスミド MBC1L24 から#23-57-137-1 抗体L鎖V領域を PCR 法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA 合成機(ABI 社)を用いて行った。後方プライマー MBCCHL1 (配列番号 21) は Hind III 認識配列と Kozak 配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) を、前方プライマー MBCCHL3 (配

列番号22)はBglIII、EcoRI 認識配列を有するように設計した。

PCR は、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、0.1 μg の MBC1L24、プライマーとして MBCCHL1 および MBCCHL3 を各 50pmole、1 μl の AmpliTaq (PERKIN ELMER) を含有する 100 μl の反応混合液を用い、50 μl の鉱油を上層して 94℃にて 45 秒間、60℃にて 45 秒間、72℃にて 2 分間の温度サイクルで 30 回行った。

444bp の PCR 産物を 3% 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 20 μl に溶解した。PCR 産物 1 μl をそれぞれ 10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、50mM NaCl、8 U の Hind III (宝酒造) および 8 U の EcoRI (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μl 中で 37℃にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 8 μl に溶解した。

プラスミド pUC19 1 μg を同様に Hind III および EcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ (E. coli C75, 宝酒造) で BAP 処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 10 μl に溶解した。

BAP 処理したプラスミド pUC19 1 μl と先の PCR 産物 4 μl を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) に前述と同様に形質転換した。これを 50 μg/ml アンピシリンを含有する 2 × YT 寒天培地にまき、37℃で一晩培養した。得られた形質転換体を、50 μg/ml アンピシリンを含有する 2 × YT 培地 2 ml で 37℃で一晩培養した。菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドを CHL/pUC19 とした。

プラスミド Cλ/pUC19、Cκ/pUC19 各 1 μg をそれぞれ 20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、100mM KCl、8 U の Hind III (宝酒造) および 2 U の BlnI (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μl 中で 37℃にて 1 時間消化した。消化混合液を

フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した後、37℃で30分間BAP処理を行った。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNA をエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 10  $\mu$  l に溶解した。

#23-57-137-1 L鎖V領域を含むプラスミド CHL/pUC19 から8  $\mu$  gを同様に Hind III および BlnI で消化した。得られた 409bp の DNA 断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 10  $\mu$  l に溶解した。

このL鎖V領域 DNA 4  $\mu$  l をBAP処理したプラスミド C $\lambda$ /pUC19 または C $\kappa$ /pUC19 各1  $\mu$  l にサブクローニングし、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50  $\mu$  g/ml アンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地3ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミド MBC1L( $\lambda$ )/pUC19、MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 とした。

プラスミド MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 および MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 をそれぞれ EcoRI で消化し、3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bp の DNA 断片を GENECLEANII Kit (BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 10  $\mu$  l に溶解した。

発現ベクターとしてプラスミド HEF-PM1k-gk 2.7  $\mu$  g を EcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した。回収した DNA 断片を BAP 処理した後、1%低融点アガロースゲルで電気泳動し、6561bp の DNA 断片を GENECLEANII Kit (BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 10  $\mu$  l に溶解した。

BAP 処理した HEF ベクター 2  $\mu$  l を上記プラスミド MBC1L( $\lambda$ ) または MBC1L( $\kappa$ ) EcoRI 断片各3  $\mu$  l と連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50  $\mu$  g/ml アンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2ml で培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、100mM KCl、8 U の Hind III (宝酒造) および2 U の PvuI (宝酒造) を含有する反応混合液 20  $\mu$  l 中で 37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば

5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれMBC1L( $\lambda$ )/neo、MBC1L( $\kappa$ )/neoとした。

#### (4) COS-7細胞のトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミドMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L( $\lambda$ )/neoまたはMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L( $\kappa$ )/neoの組み合わせで、GenePulser装置(BioRad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に $1 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10 $\mu$ gを加え、1,500V、25 $\mu$ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgG ウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。また、COS-7細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPS IIキット(BioRad)を用いてキット添付の処方に従って行った。

#### (5) ELISA

##### (i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.02% NaN<sub>3</sub>)で1 $\mu$ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100 $\mu$ lで固相化し、200 $\mu$ lの希釈バッファー(50mM Tris-HCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN<sub>3</sub>、1% 牛血清アルブミン(BSA)、pH7.2)でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュ

ベートしPBS-Tween 20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100  $\mu$ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma 104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1 $\lambda$  Purified (The Binding Site)を用いた。

#### (ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1  $\mu$ g/mlの濃度に調製したヒトPTHrP (1-34) (ペプチド研究所) 100  $\mu$ lで固相化した。200  $\mu$ lの希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100  $\mu$ lを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma 104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。

その結果、キメラ抗体は、ヒトPTHrP (1-34) に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された (図5)。また、キメラ抗体においてL鎖C領域が $\lambda$ 鎖あるいは $\kappa$ 鎖のいずれであっても抗体のPTHrP (1-34) に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖 $\lambda$ 鎖を用いて構築した。

#### (6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞 (DXB11) に導入した。

すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドMBC1HcDNA/pCH01 とMBC1L ( $\lambda$ ) /neoまたはMBC1HcDNA/pCH01 とMBC1L ( $\kappa$ ) /neoの組み合わせで、GenePulser装置 (BioRad)

d) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収してエレクトロポレーションに用いた。PBS (-) 中に $1 \times 10^7$  細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10 $\mu$ gを加え、1,500 V, 25 $\mu$ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)を添加したMEM- $\alpha$ 培地(GIBCO)に懸濁し、3枚の96穴プレート(Falcon)を用いてCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN(G418 Sulfate, GIBCO)添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM- $\alpha$ 培地(GIBCO)の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のUltra Low IgG ウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 $\mu$ mのフィルター(Millipore)により細胞破片を除去した。

CHO細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROS プロテインA カラム(PerrSeptive Biosystems)を用いて、ConSep LC100(Millipore)にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

#### [参考例4] ヒト型化抗体の構築

##### (1) ヒト型化抗体H鎖の構築

###### (i) ヒト型化H鎖V領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1 抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製

した。ヒト抗体 S31679 (NBRF-PDB、Cuisinier A. M. ら、Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993) 由来のFRを有するヒト型化#23-57-137-1 抗体H鎖 (バージョン "a") の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1 (配列番号23) 及びMBC1HGP3 (配列番号24) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1HGP2 (配列番号25) 及びMBC1HGP4 (配列番号26) はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1HVS1 (配列番号27) 及びMBC1HVR1 (配列番号28) はCDRグラフティングプライマーMBC1HGP1及びMBC1HGP4とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20 $\mu$ lの10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA溶液に溶解した。PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、100 $\mu$ lの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4をそれぞれ1 $\mu$ l、0.25mMのdNTP、2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに50pmoleの外部プライマーMBC1HVS1及びMBC1HVR1を加え、同じ温度サイクルを30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を4%Nu Sieve



GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA溶液20 $\mu$ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhMBCHv/pUC19と命名した。

(ii) ヒト型化H鎖cDNAのためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したヒト型化H鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1HVS2はV領域のリダー配列の5'側をコードする配列とハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列 (Kozak, M, ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)、HindIIIおよびEcoRI認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2

はJ領域の3'側をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つC領域の5'側の配列をコードしApaIおよびSmaI認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、鋳型DNAとして0.4 $\mu$ gのhMBCHv/pUC19を用い、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用し、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%NuSieveGTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4), 1

mM EDTA溶液20  $\mu$ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をEcoRIおよびSmaIで消化することで調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5'側にEcoRIおよびHindIII認識配列及びKozak配列、3'側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをhMBC1Hv/pUC19と命名した。

## (2) ヒト型化抗体H鎖の発現ベクターの構築

hPM1抗体H鎖cDNAの配列を含むプラスミドRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIにて消化し、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したhMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをhMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはヒト型化#23-57-137-1抗体のH鎖V領域及びヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1を含み、5'-末端にEcoRIおよびHindIII認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19に含まれるヒト型化H鎖バージョン" a"の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号58に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号56に示す。

hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCHO1と命名した。

## (3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築

### (i) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体の作製

ヒト型化抗体とマウス（キメラ）抗体のFR領域を組み換えたL鎖遺伝子を構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflIII切断部位を利用することによって、FR1及び2はヒト抗体由来、FR3及び4はマウス抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L ( $\lambda$ ) /neo及びhMBC1L ( $\lambda$ ) /neo各10  $\mu$ gを10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01% (w/v) BSA, AflIII (宝酒造) 10Uを含有する反応混合液100  $\mu$ l中で37℃にて1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L ( $\lambda$ ) /neoから6282bpの断片(c1とする) および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L ( $\lambda$ ) /neoから6282bpの断片(h1とする) および1022bpの断片(h2とする)を、GENECLEAN II Kit (BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

回収したc1、h1断片各1  $\mu$ gについてBAP処理を行った。DNAをフェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA溶液10  $\mu$ lに溶解した。

BAP処理したc1及びh1断片1  $\mu$ lをそれぞれh2、c2断片4  $\mu$ lに連結し(4℃、一夜)、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, ApaLI (宝酒造) 2U、またはBamHI (宝酒造) 8U, HindIII (宝酒造) 8Uを含有する反応混合液20  $\mu$ l中で37℃、1時間消化した。c1-h2が正しく連結されていれば、ApaLIで5560/1246/498bp、BamHI/HindIIIで7134/269bpの消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。

これをヒトFR1, 2/マウスFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをh/mMBC1L ( $\lambda$ ) /neoとした。一方、h1-c2のクローンが得ら

れなかったので、pUCベクター上で組換えてからHEFベクターにクローニングした。その際、アミノ酸置換のないヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19、及びFR3内の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに置換したヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Ld $\lambda$ /pUC19を鋳型として用いた。

プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/pUC19、hMBC1La $\lambda$ /pUC19及びhMBC1Ld $\lambda$ /pUC19の各10 $\mu$ gを10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01% (w/v) BSA, HindIII 16U, AflIII 4Uを含有する反応混合液30 $\mu$ l中で37℃、1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/pUC19から215bp(c2')、プラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19およびhMBC1Ld $\lambda$ /pUC19からそれぞれ3218bp(ha1', hd1')のDNA断片をGENECLEAN II Kit (BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

ha1'、hd1'断片をそれぞれc2'断片に連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドm/hMBC1La $\lambda$ /pUC19、m/hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19とした。

得られたプラスミドm/hMBC1La $\lambda$ /pUC19、m/hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19をEcoRIで消化した。それぞれ743bpのDNA断片を2%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit (BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA溶液20 $\mu$ lに溶解した。

各DNA断片4 $\mu$ lを前述のBAP処理したHEFベクター1 $\mu$ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100mM KCl, HindIII (宝酒造) 8U, PvuI (宝酒造) 2Uを含有する反応混合液20 $\mu$ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれマウスFR1, 2/ヒトFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hMBC1L $\lambda$ /neo、m/hMBC1Ld $\lambda$ /neoとした。

(ii) FR1/FR2ハイブリッド抗体の作製

CDR1内にあるSnaBI切断部位を利用することによって、同様にFR1とFR2のハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/neo及びh/mMBC1L( $\lambda$ )/neoの各10 $\mu$ gを10mM Tris-HCl (pH7.9), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01% (w/v) BSA, SnaBI (宝酒造) 6Uを含有する反応混合液20 $\mu$ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。次に20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.01% (w/v) BSA, PvuI 6Uを含有する反応混合液50 $\mu$ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。

反応液を1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/neoから4955bp (m1) および2349bp (m2)、プラスミドh/mMBC1L( $\lambda$ )/neoから4955bp (hm1) および2349bp (hm2) の各DNA断片をGENECLEANII Kit (BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA溶液40 $\mu$ lに溶解した。

m1、hm1断片1 $\mu$ lをそれぞれhm2、m2断片4 $\mu$ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, Apa I (宝酒造) 8U、または Apa LI (宝酒造) 2U を含有する反応混合液 20  $\mu$ l 中で 37°C にて 1 時間消化した。

各断片が正しく連結されていれば、Apa I で 7304 bp、Apa LI で 5560 / 1246 / 498 bp (m1-hm2)、Apa I で 6538 / 766 bp、Apa LI で 3535 / 2025 / 1246 / 498 bp (hm1-m2) の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれ ヒト FR1 / マウス FR2, 3, 4 ハイブリッド抗体 L 鎖をコードする発現ベクターを hmmMBC1 L ( $\lambda$ ) / neo、マウス FR1 / ヒト FR2 / マウス FR3, 4 ハイブリッド抗体 L 鎖をコードする発現ベクターを mhmMBC1 L ( $\lambda$ ) / neo とした。

#### (4) ヒト型化抗体 L 鎖の構築

ヒト型化 #23-57-137-1 抗体 L 鎖を、PCR 法による CDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体 HSU03868 (GEN-BANK、Def tos M ら、Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) 由来の FR1、FR2 および FR3、並びにヒト抗体 S25755 (NBRF-PDB) 由来の FR4 を有するヒト型化 #23-57-137-1 抗体 L 鎖 (バージョン "a") の作製のために 6 個の PCR プライマーを使用した。

CDR-グラフティングプライマー MBC1LGP1 (配列番号 29) 及び MBC1LGP3 (配列番号 30) はセンス DNA 配列を有し、そして CDR グラフティングプライマー MBC1LGP2 (配列番号 31) 及び MBC1LGP4 (配列番号 32) はアンチセンス DNA 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 15 から 21 bp の相補的配列を有する。外部プライマー MBC1LVS1 (配列番号 33) 及び MBC1LVR1 (配列番号 34) は CDR グラフティングプライマー MBC1LGP1 及び MBC1LGP4 とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマー MBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3 および MBC1LGP4 は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出は *crush and soak* 法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ  $1\text{ nmol}$  の CDR-グラフティングプライマーを 6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさの DNA 断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、*crush and soak* 法にてゲルから回収し  $20\text{ }\mu\text{l}$  の  $10\text{ mM Tris-HCl}$  (pH 7.4),  $1\text{ mM EDTA}$  溶液に溶解した。

PCR は、*TaKaRa Ex Taq* (宝酒造) を用い、 $100\text{ }\mu\text{l}$  の反応混合液に上記の様に調製した CDR-グラフティングプライマー *MBC1LGP1*、*MBC1LGP2*、*MBC1LGP3* および *MBC1LGP4* をそれぞれ  $1\text{ }\mu\text{l}$ 、 $0.25\text{ mM}$  の dNTP、 $2.5\text{ U}$  の *TaKaRa Ex Taq* を含む条件で添付緩衝液を使用し、 $94^{\circ}\text{C}$  にて 1 分間、 $55^{\circ}\text{C}$  にて 1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、この反応混合液に  $50\text{ pmol}$  の外部プライマー *MBC1LVS1* 及び *MBC1LVR1* を加え、さらに同じ温度サイクルで

30 回反応させた。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3% *Nu Sieve GTG* アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

$421\text{ bp}$  長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、*GENECLEAN II Kit* (*BIO101*) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得られた PCR 反応混合物を *BamHI* および *HindIII* で消化することにより調製した *pUC19* にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドを *hMBCL/pUC19* と命名した。しかしながら CDR4 の 104 位 (*Kabat* の規定によるアミノ酸番号 96 位) のアミノ酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正するための修正プライマー *MBC1LGP10R* (配列番号 35) を設計し、合成した。PCR は *TaKaRa Taq* (宝酒造) を用い、 $100\text{ }\mu\text{l}$  の反応混合液に鋳型 DNA として  $0.6\text{ }\mu\text{g}$  のプラスミド *hMBCL/pUC19*、プライマーとして *MBC1LVS1* 及び *MBC1LGP10R* をそれぞれ  $50\text{ pmol}$ 、 $2.5\text{ U}$  の *TaKaRa Ex Taq* (宝酒造)  $0.25\text{ mM}$  の dNTP を含む条件で添付の

緩衝液を使用して50  $\mu$ lの鉱油を上層して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

M13 Primer M4プライマー及びM13 Primer RVプライマーを用いて塩基配列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドをHindIIIおよびBlnIで消化し、416bpの断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離した。GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をHindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドC $\lambda$ /pUC19に導入し、プラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19と命名した。このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1に導入し、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1La $\lambda$ /pCOS1と命名した。ヒト型化L鎖バージョン" a "の塩基配列 (対応するアミノ酸を含む) を配列番号 66 に示す。また、バージョン a のアミノ酸配列を配列番号 47 に示す。

バージョン" b "をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン" b "では43位 (Kabatの規定によるアミノ酸番号43位) のグリシンをプロリンに、49位 (Kabatの規定によるアミノ酸番号49位) のリジンのアスパラギン酸に変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP5R (配列番号36) とプライマーMBC1LVS1によりプラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、pUC19のBamHI, HindIII部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素HindIIIおよびAflIIIで消化し、HindIIIおよびAflIIIで消化し



たhMBC1Laλ/pUC19と連結した。

こうして得られたプラスミドをhMBC1Lbλ/pUC19とし、このプラスミドをEcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAを含む断片をプラスミドpCOS1に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lbλ/pCOS1と命名した。

バージョン“c”をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン“c”では84位(Kabatの規定によるアミノ酸番号80位)のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP6S(配列番号37)とプライマーM13 Primer RVによりプラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HIで消化したhMBC1Laλ/pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lcλ/pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lcλ/pCOS1と命名した。

バージョン“d”、“e”及び“f”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に“a”、“b”、“c”バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP11R(配列番号38)とプライマーM-S1(配列番号44)によりそれぞれhMBC1Laλ/pCOS1, hMBC1Lbλ/pCOS1, hMBC1Lcλ/pCOS1を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。塩基配列決定後、HindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したCλ/pUC

19と連結した。

こうして得られたプラスミドを順にhMBC1Ldλ/pUC19、hMBC1Leλ/pUC19、hMBC1Lfλ/pUC19とした。これらのプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Ldλ/pCOS1、hMBC1Leλ/pCOS1、hMBC1Lfλ/pCOS1と命名した。

バージョン“g”及び“h”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に“a”、“d”バージョンの36位(Kabatの規定によるアミノ酸番号36位)のヒスチジンをチロシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP9R(配列番号39)およびM13 Primer RVをプライマーとして用いて、hMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物とM13 Primer M4をプライマーとして用いて、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてさらにPCRを行った。得られたDNA断片をHindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することで調製したプラスミドCλ/pUC19にサブクローニングした。このプラスミドを鋳型として、プライマーMBC1LGP13R(配列番号40)とMBC1LVS1をプライマーとしたPCRを行った。得られたPCR断片をApaIおよびHindIIIで消化し、ApaIおよびHindIIIで消化したプラスミドhMBC1Laλ/pUC19およびhMBC1Ldλ/pUC19に導入した。塩基配列を決定し、正しい配列を含むプラスミドを順にhMBC1Lgλ/pUC19およびhMBC1Lhλ/pUC19とし、これらのプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Lgλ/pCOS1およびhMBC1Lhλ/pCOS1と命名した。

バージョン“i”、“j”、“k”、“l”、“m”、“n”および“o”をPCR法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S(配列番号4

1) とプライマーV1RV ( $\lambda$ ) (配列番号43) によりプラスミドhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をApaIおよびBlnIで消化し、ApaIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pUC19にサブクローニングした。塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドをhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pUC19 ( $x=i, j, k, l, m, n, o$ ) とし、このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pCOS1 ( $x=i, j, k, l, m, n, o$ ) と命名した。バージョン"j"、"l"、"m" および"o"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号67、68、69、70に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号48、49、50、51に示す。

バージョン"p"、"q"、"r"、"s" および"t"は、バージョン"i"、"j"、"m"、"l"または"o"のアミノ酸配列の87位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3内にある制限酵素Aor51MI切断部位を利用して、バージョン"h"を、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l"または"o"とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミドhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pCOS1 ( $x=i, j, m, l, o$ ) 中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpを除き、ここに発現プラスミドhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pCOS1 中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpをつなぐことにより91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンとなるようにした。塩基配列決定を行い、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l" および"o"の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンに置換されたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ"p"、"q"、"s"、"r" および"t"とし、得られたプラスミドをhMBC1L $\alpha$  $\lambda$ /pCOS1 ( $x=p, q, s, r, t$ ) と命名した。バージョン"q"、"r"、"s" および"t"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号71、72、

73、74 に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 52、53、54、55 に示す。

プラスミド hMBC1Lqλ/pCOS1 を HindIII および EcoRI で消化し、HindIII および EcoRI で消化したプラスミド pUC19 にサブクローニングし、プラスミド hMBC1Lqλ/pUC19 と命名した。

ヒト型化L鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表2に示す。

表2 配列表における置換アミノ酸の位置

(Kabat の規定によるアミノ酸番号)

バージョン	36	43	45	47	49	80	87
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラギン酸、Iはイソロイシンを示す。

なお、前記プラスミド hMBC1HcDNA/pUC19 および hMBC1Lqλ/pUC19 を有する大腸菌は *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) および *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、*Escherichia c*

oli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) についてはFERM BP-5629、Escherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) についてはFERM BP-5630としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### (5) COS-7細胞へのトランスフェクション

ハイブリッド抗体およびヒト型化#23-57-137-1 抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。すなわち鎖状ハイブリッド抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1 と h/mMBC1L(λ)/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1 と m/hMBC1Laλ/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1 と m/hMBC1Ldλ/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1 と hmmMBC1L(λ)/neo、またはhMBC1HcDNA/pCOS1 と mhmMBC1L(λ)/neoとの組み合わせを、GenePulser装置(BioRad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に $1 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10μgを加え、1,500V、25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgG ウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

ヒト型化#23-57-137-1 抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1 と hMBC1Lxλ/pCOS1 (x=a~t)のいずれかの組み合わせをGenePulser装置(BioRad)を用いて、前記ハイブリッド抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。

また、COS-7細胞の培養上清からのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPS IIキット(BioRad)を用いて、キット添付の処方に従って行った。

## (6) ELISA

## (i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M  $\text{NaHCO}_3$ 、0.02%  $\text{NaN}_3$ ) で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO)  $100\mu\text{l}$ で固相化し、 $200\mu\text{l}$ の希釈バッファー (50mM Tris-HCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02%  $\text{NaN}_3$ 、1% 牛血清アルブミン (BSA)、pH 7.2) でブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO)  $100\mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、 $1\text{mg}/\text{ml}$ の基質溶液 (Sigma 104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1 $\lambda$  Purified (The Binding Site) を用いた。

## (ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヒトPTHrP (1-34)  $100\mu\text{l}$ で固相化した。 $200\mu\text{l}$ の希釈バッファーでブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO)  $100\mu\text{l}$ を加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、 $1\text{mg}/\text{ml}$ の基質溶液 (Sigma 104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。

## (7) 活性確認

## (i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン“a”とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPTHrP結合能が同等であった(図6)。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバージョン“a”で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン“a”をヒト型化抗体のH鎖として供した。

## (ii) ハイブリッド抗体の活性

## (ii-a) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体

L鎖がh/mMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、m/hMBC1Lαあるいはm/hMBC1Ldλの場合はいずれもキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した(図7)。これらの結果は、FR3, 4はヒト型化抗体として問題ないが、FR1, 2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

## (ii-b) FR1/FR2ハイブリッド抗体

L鎖がmhmMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、hmmMBC1L(λ)の場合はキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した(図8)。これらの結果は、FR1, 2のうちFR1はヒト型化抗体として問題ないが、FR2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

## (iii) ヒト型化抗体の活性

L鎖としてバージョン“a”から“t”の各々一つを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン“j”、“l”、“m”、“o”、“q”、“r”、“s”、“t”を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のPTHrP結合能を示した(図9~12)。

## (8) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドhMB

C1HcDNA/pCH01 と hMBC1Lmλ/pCOS1 または hMBC1HcDNA/pCH01 と hMBC1Lqλ/pCOS1 あるいは hMBC1HcDNA/pCH01 と hMBC1Lrλ/pCOS1 の組み合わせで、GenePulser装置 (BioRad) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS (-) 中に $1 \times 10^7$  細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10μgを加え、1,500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清 (GIBCO) 添加、MEM-α培地 (GIBCO) に懸濁し、96穴プレート (Falcon) を用いてCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) および500mg/mlのGENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM-α培地 (GIBCO) の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%の Ultra Low IgG ウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM-α培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2μmのフィルター (Millipore) により細胞破片を除去した。CHO細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROS プロテインAカラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

#### [参考例5] 中和活性の測定



マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉腫細胞株ROS17/2.8-5細胞を用いて行った。すなわち、ROS17/2.8-5細胞を、10%牛胎児血清(GIBCO)を含むHam'SF-12培地(GIBCO)中に、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。ROS17/2.8-5細胞を96穴プレートに10<sup>4</sup>細胞/100μl/穴で蒔込み1日間培養し、4mMのヒドロコルチゾンと10%牛胎児血清を含むHam'SF-12培地(GIBCO)に交換する。さらに3ないし4日間培養した後、260μlのHam'SF-12培地(GIBCO)にて洗浄し、1mMのイソブチル-1-メチルキサンチン(IBMx, SIGMA)および10%の牛胎児血清と10mMのHEPESを含む80μlのHam'sF-12を加え、30分間37℃でインキュベートした。

中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ10μg/ml、3.3μg/ml、1.1μg/mlおよび0.37μg/mlの群、10μg/ml、2μg/ml、0.5μg/mlおよび0.01μg/mlの群、または10μg/ml、5μg/ml、1.25μg/ml、0.63μg/mlおよび0.31μg/mlの群に段階希釈し、4ng/mlに調製したPTHrP(1-34)と等量混合し、各抗体とPTHrP(1-34)の混合液80μlを各穴に添加した。各抗体の最終濃度は、上記抗体濃度の4分の1になり、PTHrP(1-34)の濃度は、1ng/mlになる。10分間室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBSにて3回洗浄した後、100μlの0.3%塩酸95%エタノールにて細胞内のcAMPを抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit (CAYMANCHEMICAL'S) 付属のEIAバッファー120μlを添加しcAMPを抽出後、cAMP EIA kit (CAYMANCHEMICAL'S) 添付の処方に従ってcAMPを測定した。その結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有するL鎖バージョンのうち、91位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン"q"がもっとも強い中和能を示した(図13~15)。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪液質治療剤が提供される。

上記物質は、悪液質モデル動物での薬効試験において、体重減少を対照と比較して抑制し、また、生存期間の延長効果も奏することから、悪液質治療剤として有用である。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

AAATAGCCCT TGACCAGGCA

20

配列番号：2

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTCCAGA ATCGATAG

38

配列番号：3

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGATCCCGGG CCACTGGATA GACAGATG

28

配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGATCCCGG TCAGRGAAG GTGGRAACA

29

配列番号：5

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTTTCCAG TCACGAC

17

配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CAGGAAACAG CTATGAC

17

配列番号 : 7

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列 :

GTCTAAGCTT CCACCATGAA ACTTCGGGCT C

31

配列番号 : 8

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列 :

TGTTGGATCC CTGCAGAGAC AGTGACCAGA

30

配列番号 : 9

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列 :

GTCTGAATTC AAGCTTCCAC CATGGGGTTT GGGCTG

36

配列番号 : 10

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TTTCCCGGGC CCTTGGTGGG GGCTGAGGAG ACGGTGACCA G 41

配列番号：11

配列の長さ：109

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCCCACGGTC ACCCTGTTCC 60

CGCCCTCCTC TGAGGAGCTC CAAGCCAACA AGGCCACACT AGTGTGTCT 109

配列番号：12

配列の長さ：110

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGTTTGGTGG TCTCCACTCC CGCCTTGACG GGGCTGCCAT CTGCCTTCCA GGCCACTGTC 60

ACAGCTCCCG GGTAGAAGTC ACTGATCAGA CACACTAGTG TGGCCTTGTT 110

配列番号：13

配列の長さ：98

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

```
GGAGTGGAGA CCACCAAACC CTCCAAACAG AGCAACAACA AGTACGCGGC CAGCAGCTAC 60
CTGAGCCTGA CGCCCGAGCA GTGGAAGTCC CACAGAAG 98
```

配列番号：14

配列の長さ：106

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

```
TGTTGAATTC TTACTATGAA CATTCTGTAG GGGCCACTGT CTTCTCCACG GTGCTCCCTT 60
CATGCGTGAC CTGGCAGCTG TAGCTTCTGT GGGACTTCCA CTGCTC 106
```

配列番号：15

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

```
GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCC 43
```

配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC TTACTATGAA

20

配列番号：17

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTACCTGAG CCTGACGCC

39

配列番号：18

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTAGCTGCTG GCCGCGTACT TGTTGTTGCT CTGTTTGGA

39



配列番号：19

配列の長さ：46

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTC CTAGGTCGAA CTGTGGCTGC ACCATC

46

配列番号：20

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC TTACTAACAC TCTCCCTGT TGAA

34

配列番号：21

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGC CTGGACTCCT CTCTT

35

配列番号：22

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC AGATCTAACT ACTTACCTAG GACAGTGACC TTGGTCCC 48

配列番号：23

配列の長さ：128

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG AGCTGGGTTT TCCTCGTTGC TCTTTTAAGA 60  
GGTGTCCAGT GTCAGGTGCA GCTGGTGGAG TCTGGGGGAG GCGTGGTCCA GCCTGGGAGG 120  
TCCCTGAG 128

配列番号：24

配列の長さ：125

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACCATTAGTA GTGGTGGTAG TTACACCTAC TATCCAGACA GTGTGAAGGG GCGATTCACC 60  
ATCTCCAGAG ACAATTCCAA GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCTGAG 120

GACAC

125

配列番号：25

配列の長さ：132

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTACCACCAC TACTAATGGT TGCCACCCAC TCCAGCCCCT TGCCTGGAGC CTGGCGGACC 60

CAAGACATGC CATAGCTACT GAAGGTGAAT CCAGAGGCTG CACAGGAGAG TCTCAGGGAC 120

CTCCCAGGCT GG 132

配列番号：26

配列の長さ：110

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG GTTCCCTGGC CCCAGTAAGC AAAGTAAGTC 60

ATAGTAGTCT GTCTCGCACA GTAATACACA GCCGTGTCCT CAGCTCTCAG 110

配列番号：27

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG

30

配列番号：28

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG

30

配列番号：29

配列の長さ：133

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACAAAGCTTC CACCATGGCC TGGACTCCTC TCTTCTTCTT CTTTGTTCTT CATTGCTCAG 60

GTTCTTTCTC CCAGCTTGTG CTGACTCAAT CGCCCTCTGC CTCTGCCTCC CTGGGAGCCT 120

CGGTCAAGCT CAC 133

配列番号：30

配列の長さ：118

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

AGCAAGATGG AAGCCACAGC ACAGGTGATG GGATTCCTGA TCGCTTCTCA GGCTCCAGCT 60  
CTGGGGCTGA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGTC TGAGGATGAG GCTGACTA 118

配列番号：3 1

配列の長さ：1 2 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTGTGGCTTC CATCTTGCTT AAGTTTCATC AAGTACCGAG GGCCCTTCTC TGGCTGCTGC 60  
TGATGCCATT CAATGGTGTA CGTACTGTGC TGACTACTCA AGGTGCAGGT GAGCTTGACC 120  
GAGGCTCC 128

配列番号：3 2

配列の長さ：1 1 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CCCTCACAAA 60  
TTGTTCCCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GTAATAGTCA GCCTCATCCT CAGA 114

配列番号：3 3

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACAAAGCTTC CACCATG

17

配列番号：34

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCT

19

配列番号：35

配列の長さ：75

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60

TTGTTCTTA ATTGT 75

配列番号：36

配列の長さ：4 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

AAAGGATCCT TAAGATCCAT CAAGTACCGA GGGGGCTTCT CTG

43

配列番号：3 7

配列の長さ：4 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACAAAGCTTA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGCC TGAGGA

46

配列番号：3 8

配列の長さ：1 1 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60

TTGTTCCCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GATATAGTCA GCCTCATCCT C 111

配列番号：3 9

配列の長さ：4 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTCTCTGGC TGCTGCTGAT ACCATTCAAT GGTGTACGTA CT

42

配列番号：4 0

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CGAGGGCCCT TCTCTGGCTG CTGCTG

26

配列番号：4 1

配列の長さ：3 5

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GAGAAGGGCC CTARGTACST GATGRAWCTT AAGCA

35

配列番号：4 2

配列の長さ：3 5



配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CACGAATTCA CTATCGATTC TGGAACCTTC AGAGG

35

配列番号：4 3

配列の長さ：1 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGCTTGAGC TCCTCAGA

18

配列番号：4 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GACAGTGGTT CAAAGTTTTT

20

配列番号：4 5

配列の長さ：1 1 8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15
Ala	Ser	Ala	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25					30
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Leu	Lys	Pro	Pro	Lys
				35					40					45
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
				50					55					60
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Asp	Arg
				65					70					75
Tyr	Leu	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Met	Tyr
				80					85					90
Ile	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
				95					100					105
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				110					115					

配列番号：4 6

配列の長さ：1 1 8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr  
 50 55 60  
 Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe  
 95 100 105  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 110 115

配列番号 : 47

配列の長さ : 116

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30  
 Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 35 40 45  
 Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg		
65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		
80	85	90
Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val		
95	100	105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
110	115	

配列番号 : 48

配列の長さ : 118

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr		
20	25	30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys		
35	40	45
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp		
50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg		
65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		
80	85	90

Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110 115

配列番号 : 49

配列の長さ : 118

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr

20 25 30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys

35 40 45

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg

65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110 115

配列番号 : 5 0

配列の長さ : 1 1 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25					30
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg
				35					40					45
Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
				50					55					60
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg
				65					70					75
Tyr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr
				80					85					90
Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
				95					100					105
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				110					115					

配列番号 : 5 1

配列の長さ : 1 1 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

## 配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30  
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 35 40 45  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp  
 50 55 60  
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg  
 65 70 75  
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 80 85 90  
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
 95 100 105  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

配列番号：52

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

## 配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys  
 35 40 45  
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp  
 50 55 60  
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg  
 65 70 75  
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 80 85 90  
 Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
 95 100 105  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

配列番号 : 53

配列の長さ : 118

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30  
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 35 40 45  
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp  
 50 55 60  
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg



65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		
80	85	90
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val		
95	100	105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro		
110	115	

配列番号 : 5 4

配列の長さ : 1 1 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr		
20	25	30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys		
35	40	45
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp		
50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg		
65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		
80	85	90
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val		
95	100	105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110

115

配列番号 : 5 5

配列の長さ : 1 1 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr

20

25

30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg

35

40

45

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

50

55

60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg

65

70

75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80

85

90

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95

100

105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110

115

配列番号 : 5 6

配列の長さ : 1 1 8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20						25				30
Ser	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr
				50						55				60
Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65						70				75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80						85				90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Thr	Thr	Met	Thr	Tyr	Phe
				95						100				105
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
				110						115				

配列番号：57

配列の長さ：411

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG AAC TTC GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA	45
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys	
-15 -10 -5	
GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA	90
Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu	
1 5 10	
GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	135
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly	
15 20 25	
TTC ACT TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG ATT CGC CAG ACT CCA	180
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro	
30 35 40	
GAC AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT	225
Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser	
45 50 55	
TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC	270
Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
60 65 70	
AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTA TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG	315
Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu	
75 80 85	
AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TTT TAC TGT GCA AGA CAG ACT ACT	360
Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr	
90 95 100	
ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC	405
Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
105 110 115	
TCT GCA	411

Ser Ala

配列番号 : 5 8

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

ATG GGG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTC GTT GCT CTT TTA AGA	45
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg	
-15 -10 -5	
GGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG	90
Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val	
1 5 10	
GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	135
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly	
15 20 25	
TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA	180
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro	
30 35 40	
GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT	225
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser	
45 50 55	
TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC	270
Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
60 65 70	
AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	315

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
                   75                                  80                                  85  
 AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAG ACT ACT 360  
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr  
                   90                                  95                                  100  
 ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC 405  
 Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
                   105                                  110                                  115  
 TCC TCA 411  
 Ser Ser

配列番号 : 5 9

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1                                  5                                  10

配列番号 : 6 0

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1                                  5

配列番号 : 6 1

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

配列番号 : 6 2

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

配列番号 : 6 3

配列の長さ : 1 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

配列番号 : 6 4

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

配列番号 : 6 5

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15 -10 -5	
GGT TCT TTC TCC CAA CTT GTG CTC ACT CAG TCA TCT TCA GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser	
1 5 10	
TTC TCC CTG GGA GCC TCA GCA AAA CTC ACG TGC ACC TTG AGT AGT	135
Phe Ser Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAA CAG CCA CTC	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu	
30 35 40	



```

AAG CCT CCT AAG TAT GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
      45              50              55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCT GGA TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
      60              65              70

GGT GCT GAT CGC TAC CTT AGC ATT TCC AAC ATC CAG CCA GAA GAT 315
Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp
      75              80              85

GAA GCA ATG TAC ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
      90              95              100

TTT GTG TAT GTT TTC GGC GGT GGG ACC AAG GTC ACT GTC CTA GGT 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
      105             110             115

CAG CCC 411
Gln Pro

```

配列番号 : 6 6

配列の長さ : 4 0 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
      -15             -10             -5

```

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1 5 10	
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT CGG TAC TTG ATG AAA CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90 95 100	
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGT	405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
105 110 115	

配列番号 : 6 7

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15 -10 -5	
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1 5 10	
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90 95 100	

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405  
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 105 110 115  
 CAG CCC 411  
 Gln Pro

配列番号：68

配列の長さ：411

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
 -15 -10 -5  
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
 1 5 10  
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135  
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser  
 15 20 25  
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180  
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu  
 30 35 40  
 AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225  
 Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His  
 45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270  
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
 60 65 70  
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315  
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp  
 75 80 85  
 GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360  
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln  
 90 95 100  
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405  
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 105 110 115  
 CAG CCC 411  
 Gln Pro

配列番号 : 6 9

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
 -15 -10 -5  
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
 1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90 95 100	
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
105 110 115	
CAG CCC	411
Gln Pro	

配列番号 : 7 0

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15 -10 -5	
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1 5 10	
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90 95 100	
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105

110

115

CAG CCC 411

Gln Pro

配列番号 : 7 1

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser

-15

-10

-5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1

5

10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15

20

25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30

35

40

AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45

50

55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270



Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
60 65 70  
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315  
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp  
75 80 85  
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360  
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln  
90 95 100  
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405  
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
105 110 115  
CAG CCC 411  
Gln Pro

配列番号 : 7 2

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列 :

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
-15 -10 -5  
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
1 5 10  
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90 95 100	
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
105 110 115	
CAG CCC 411	
Gln Pro	

配列番号 : 7 3

配列の長さ : 4 1 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15 -10 -5	
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1 5 10	
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90 95 100	
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	

105 110 115  
 CAG CCC 411  
 Gln Pro

配列番号：74

配列の長さ：411

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
 -15 -10 -5  
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
 1 5 10  
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135  
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser  
 15 20 25  
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180  
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu  
 30 35 40  
 AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225  
 Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His  
 45 50 55  
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270  
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60	65	70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315		
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp			
75	80	85	
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360		
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln			
90	95	100	
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405		
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
105	110	115	
CAG CCC	411		
Gln Pro			

配列番号 : 7 5

配列の長さ : 3 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile	
1 5 10 15	
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu	
20 25 30	
Ile His Thr Ala	

## 請求の範囲

1. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤。
2. 物質が副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニストである請求項 1 記載の悪液質治療剤。
3. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体である請求項 1 記載の悪液質治療剤。
4. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体断片及び／又はその修飾物である請求項 1 記載の悪液質治療剤。
5. 抗体がヒト型化又はキメラ化されたものである請求項 3 又は 4 記載の悪液質治療剤。
6. ヒト型化抗体がヒト型化#23-57-137-1 抗体である請求項 5 記載の悪液質治療剤。
7. 抗体がモノクローナル抗体である請求項 3 又は 4 記載の悪液質治療剤。
8. 悪液質が癌由来のものである請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の悪液質治療剤。

図 1

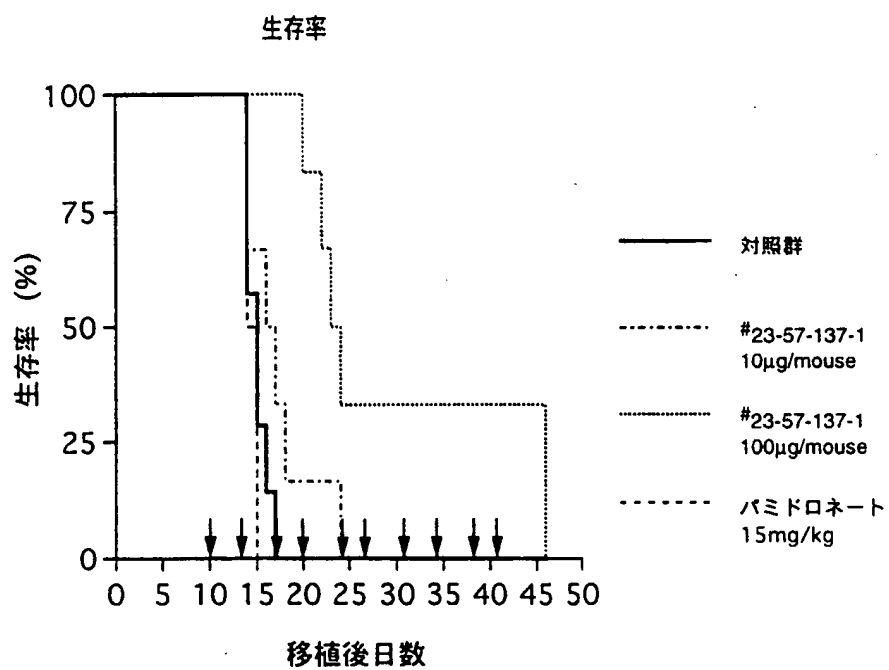


図 2

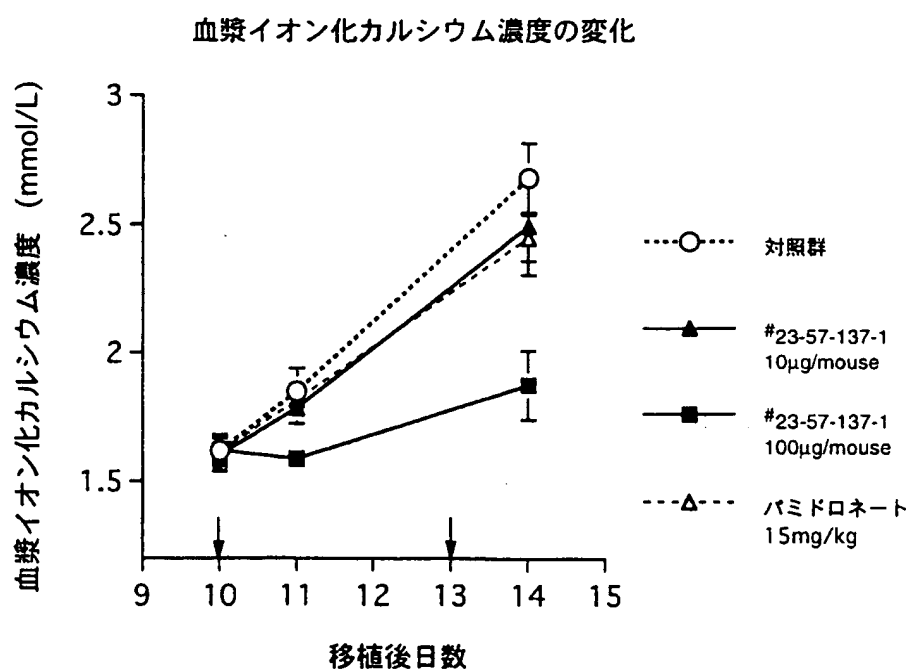




図 3

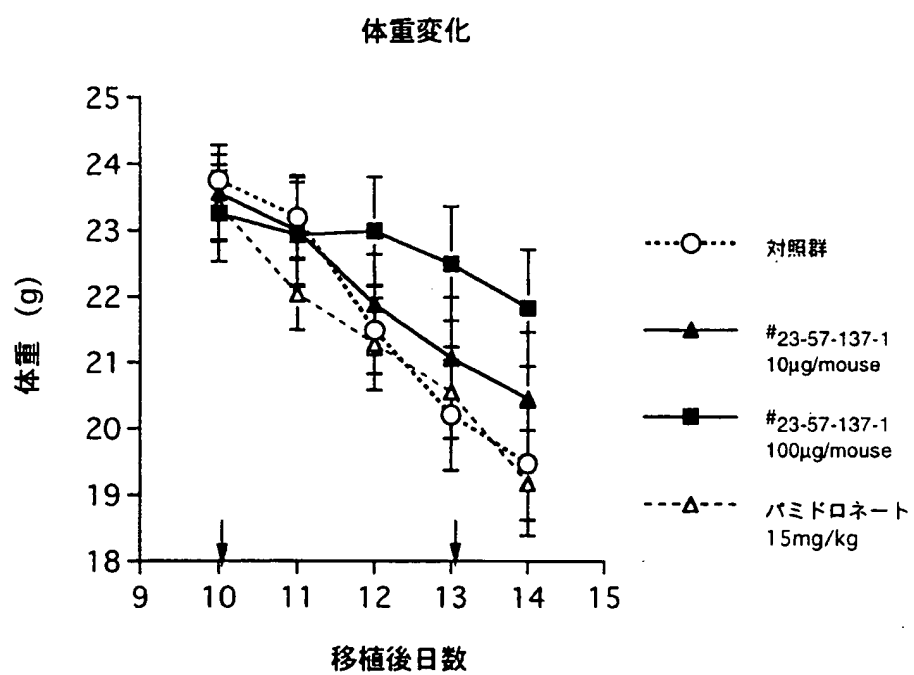


図 4

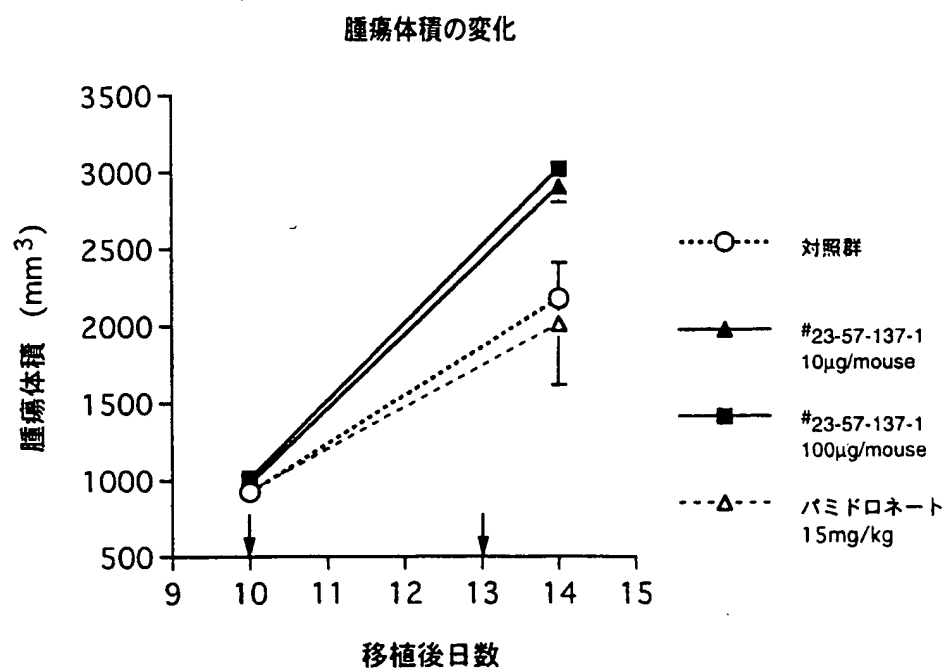


図 5

## 抗原結合活性の測定

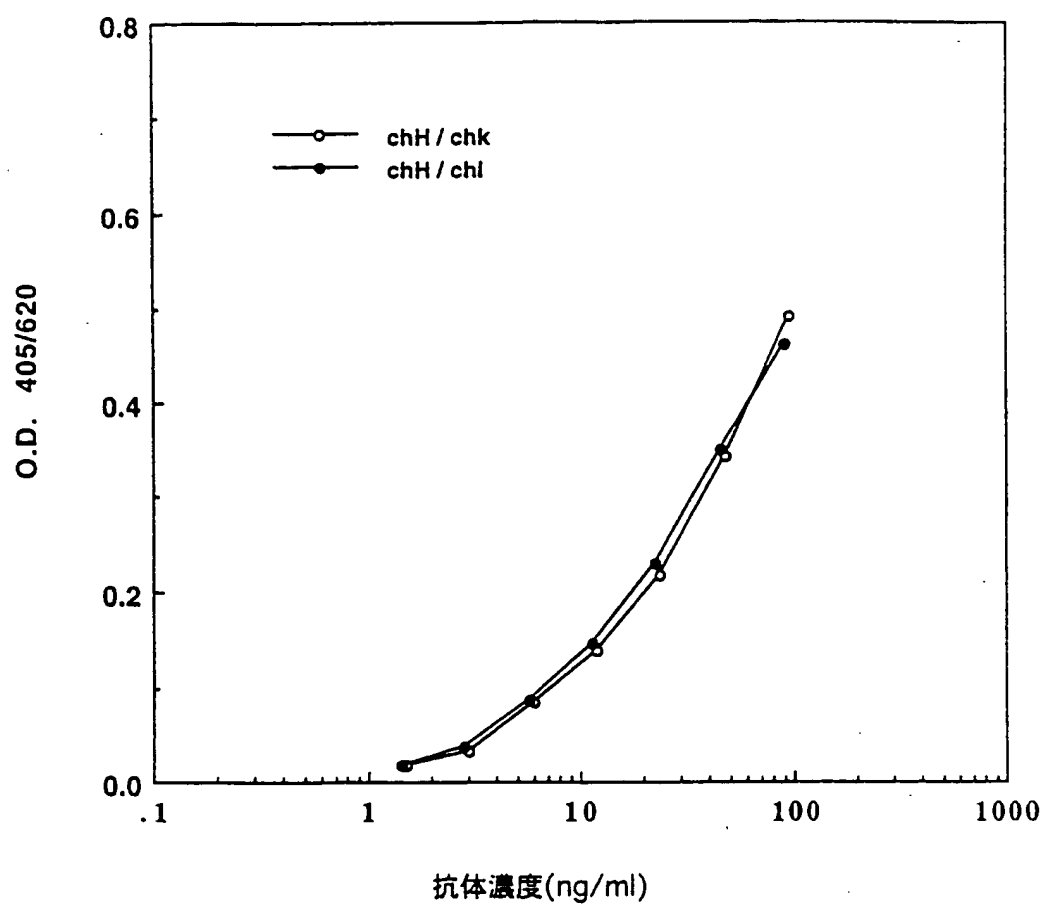


図 6

## 抗原結合活性の測定

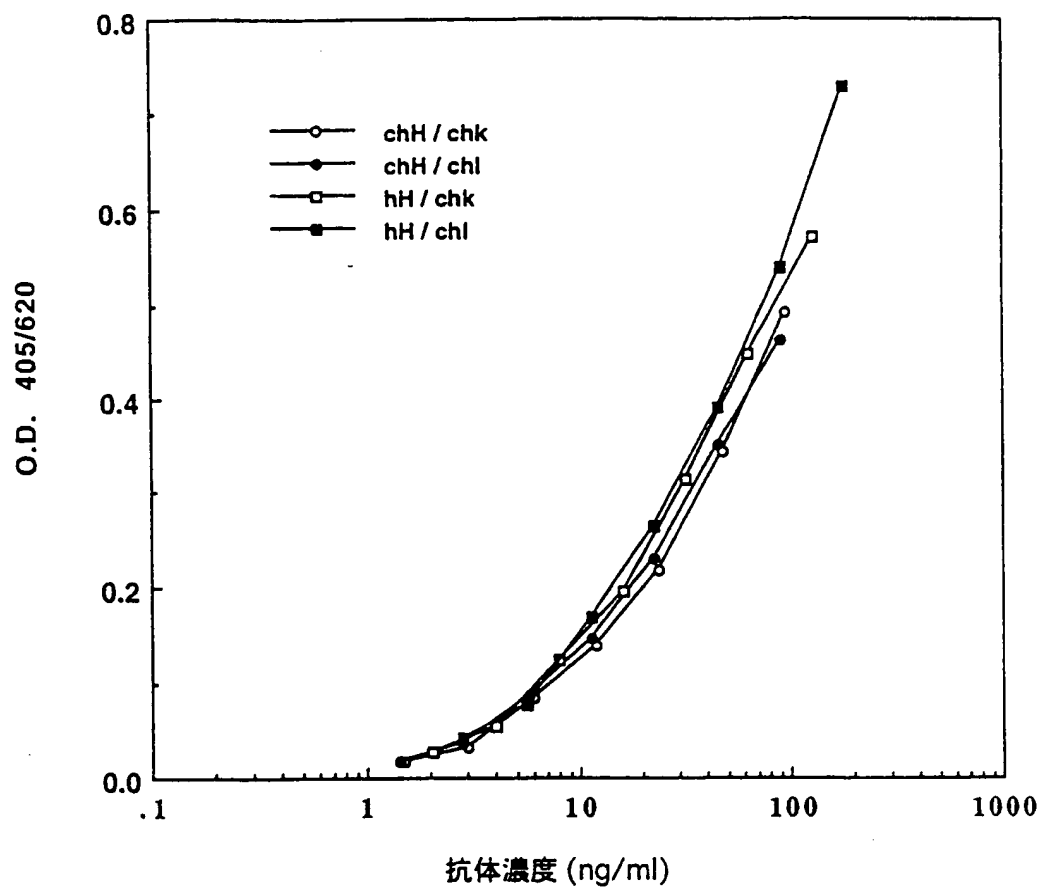


図 7

## 抗原結合活性の測定

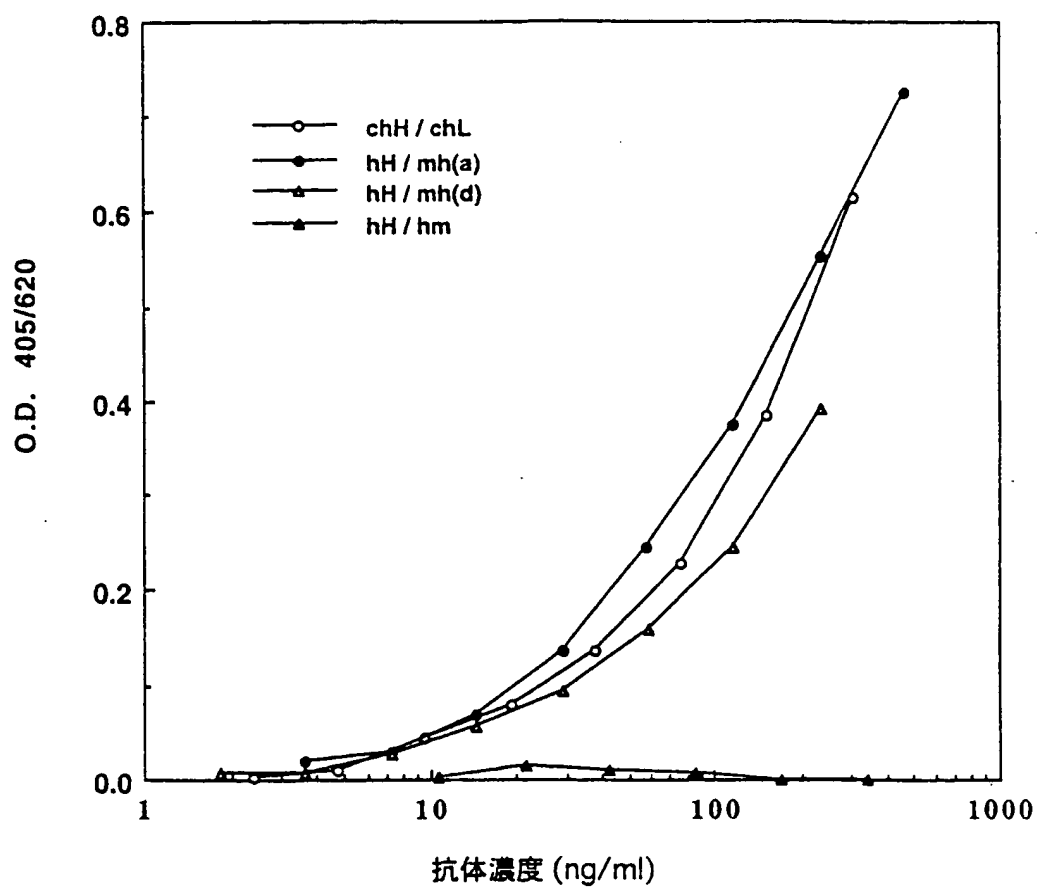


図 8

## 抗原結合活性の測定

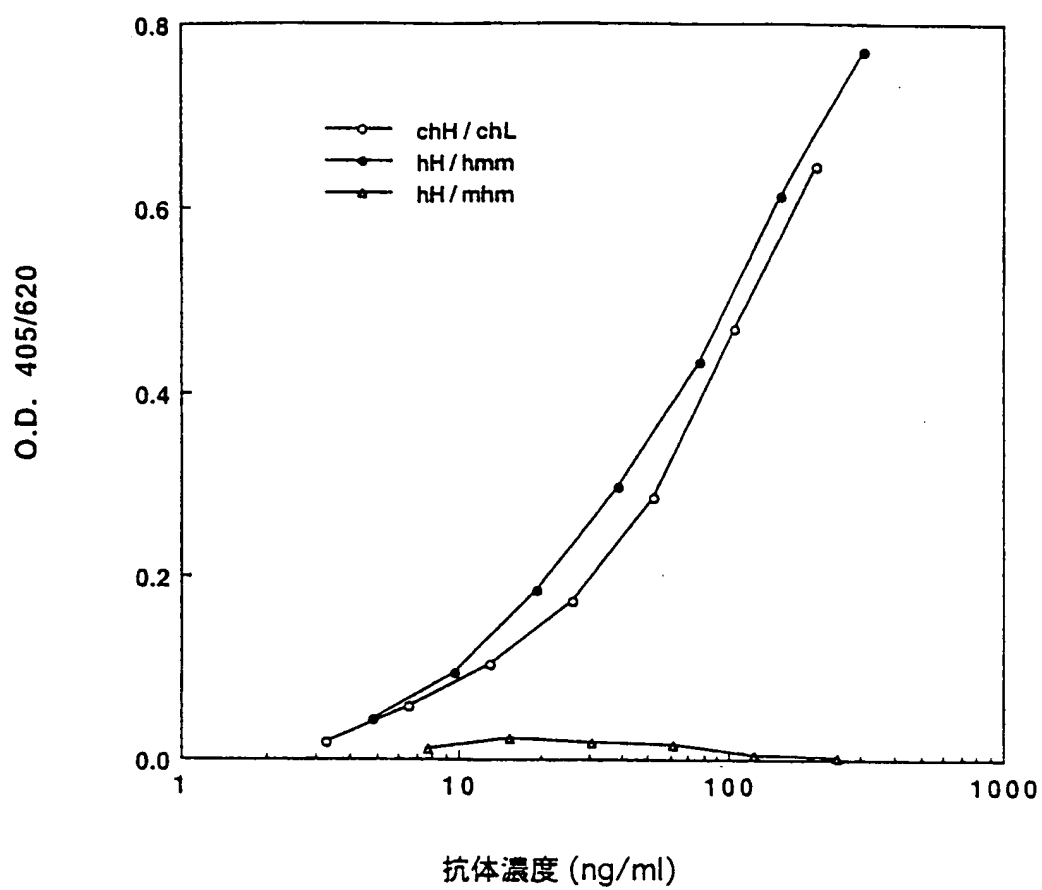


図 9

## 抗原結合活性の測定

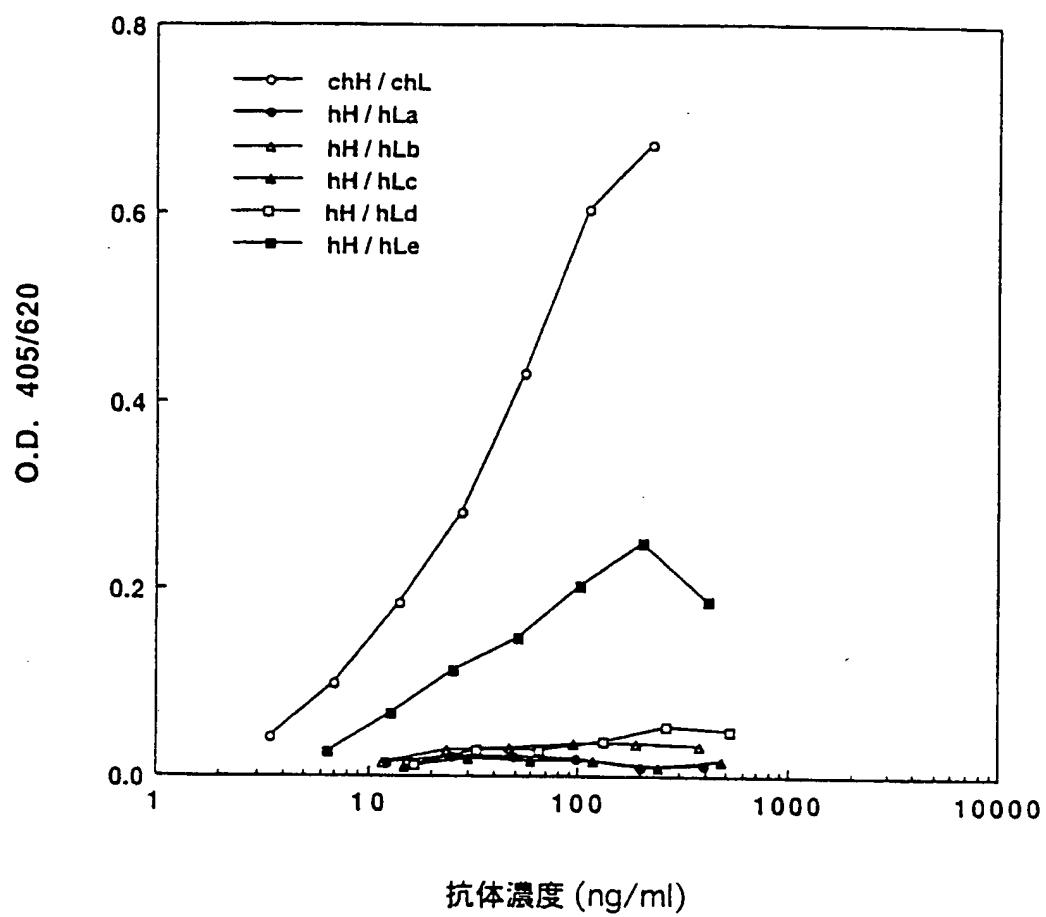


図 10

## 抗原結合活性の測定

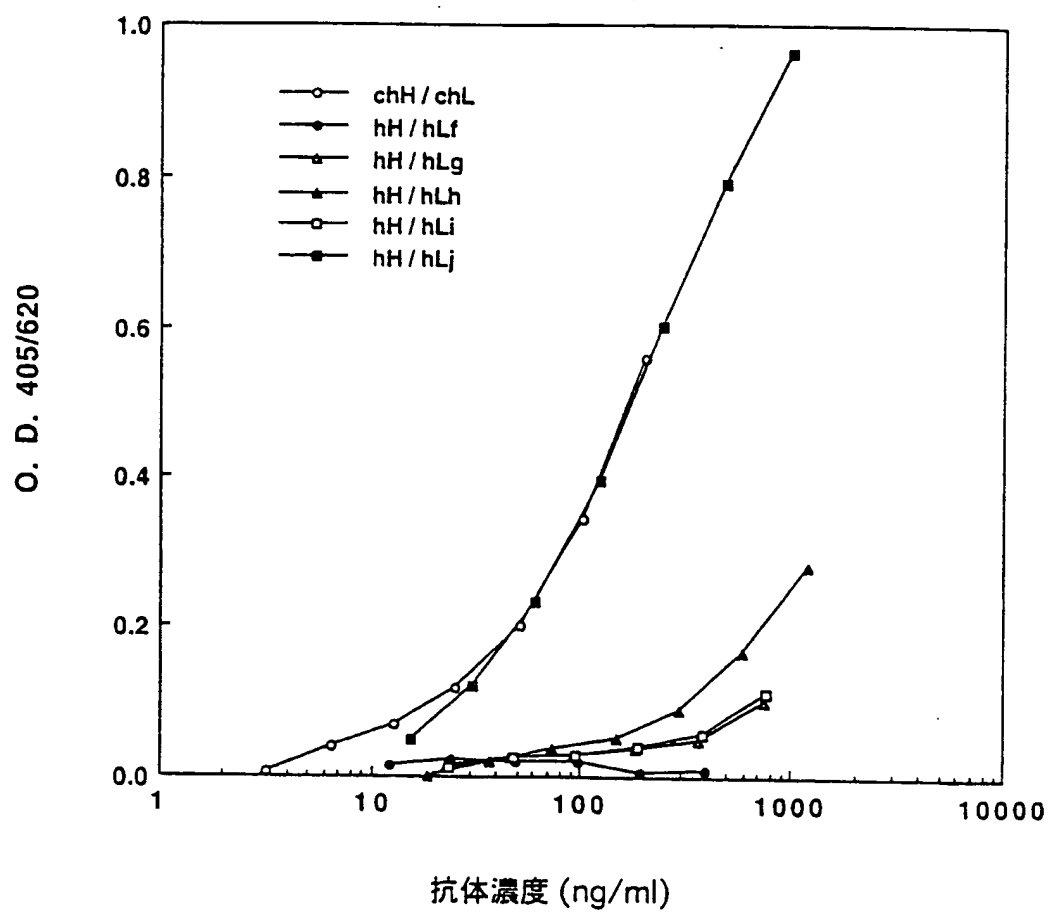




図 1 1

## 抗原結合活性の測定

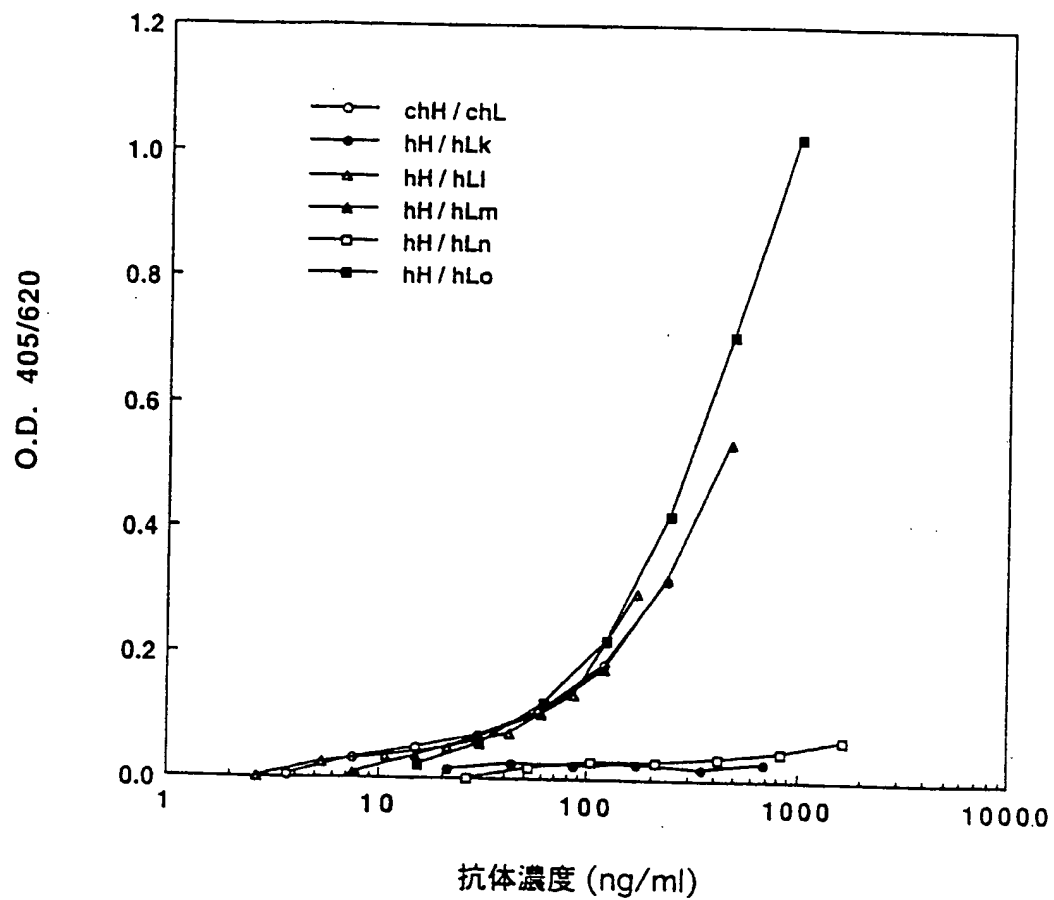


図 1 2

## 抗原結合活性の測定

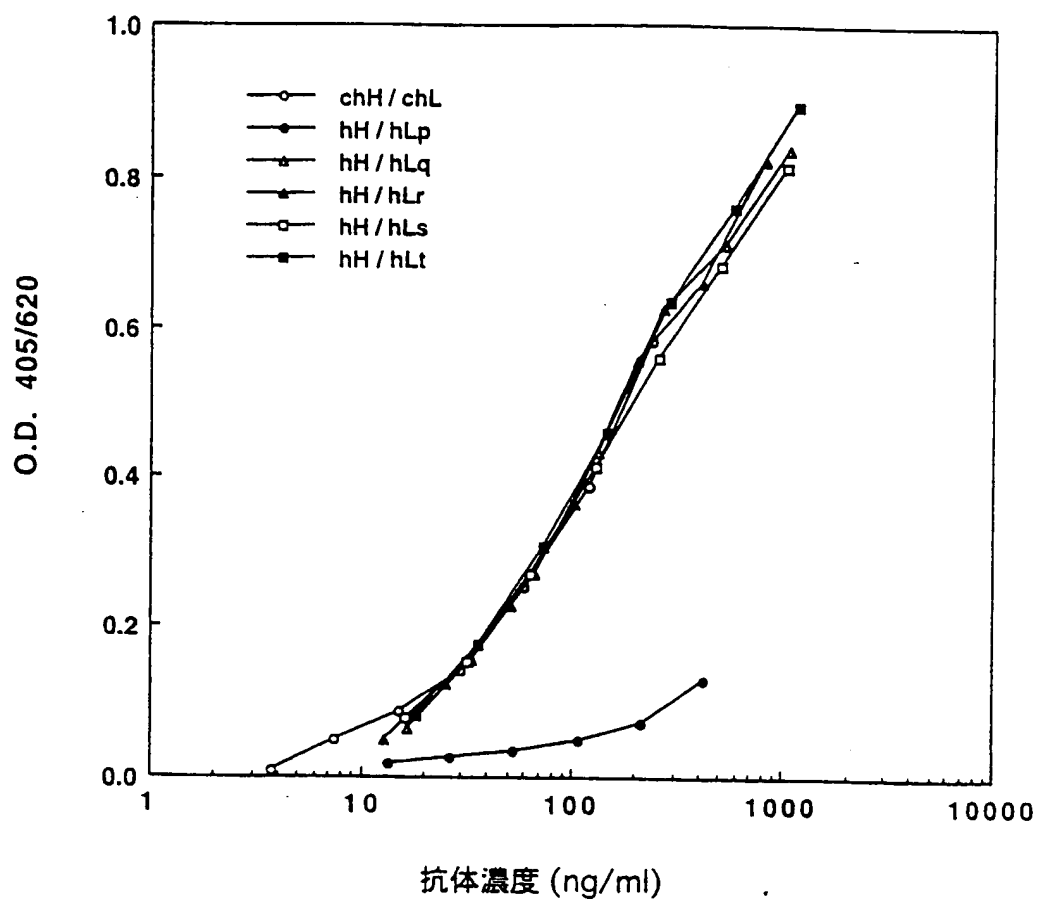


図 1 3

ヒト型化抗 PTHrP(1-34) 抗体の中和活性

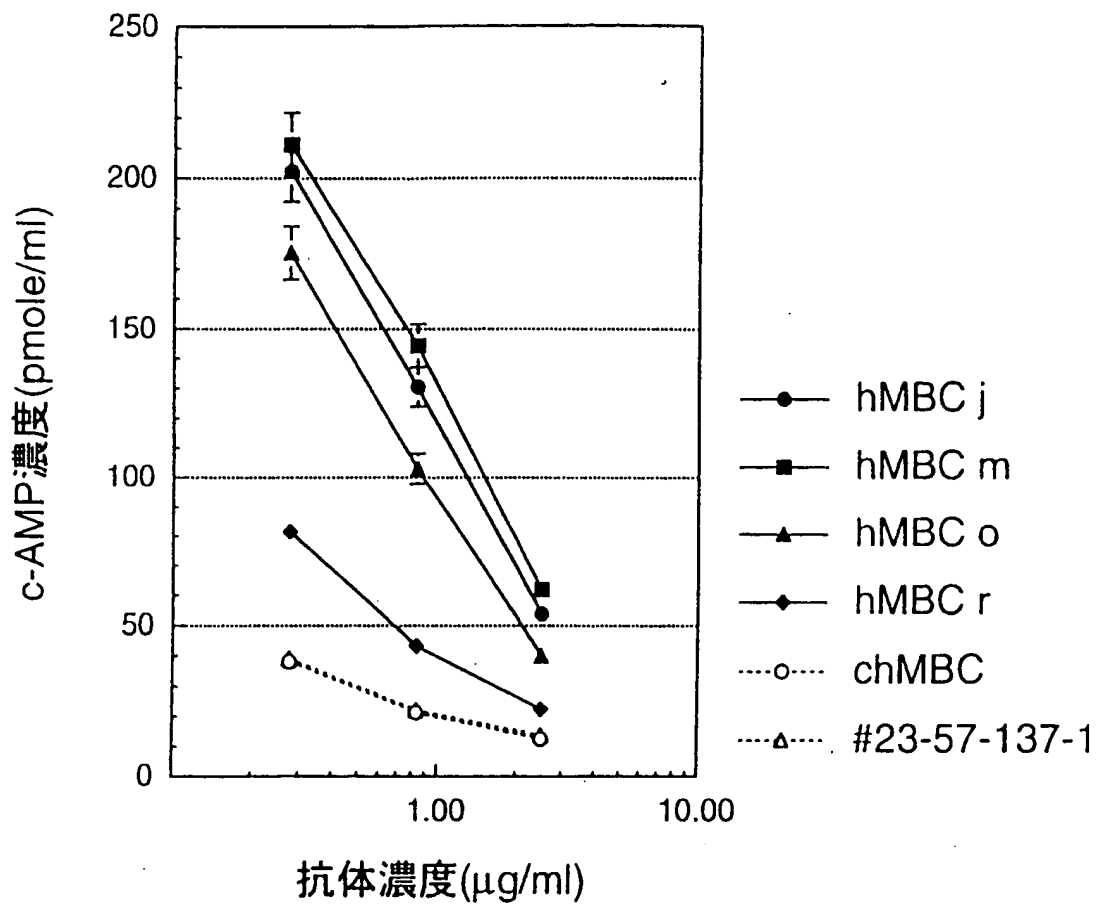


図 1 4

ヒト型化抗 PTHrP(1-34) 抗体の中和活性

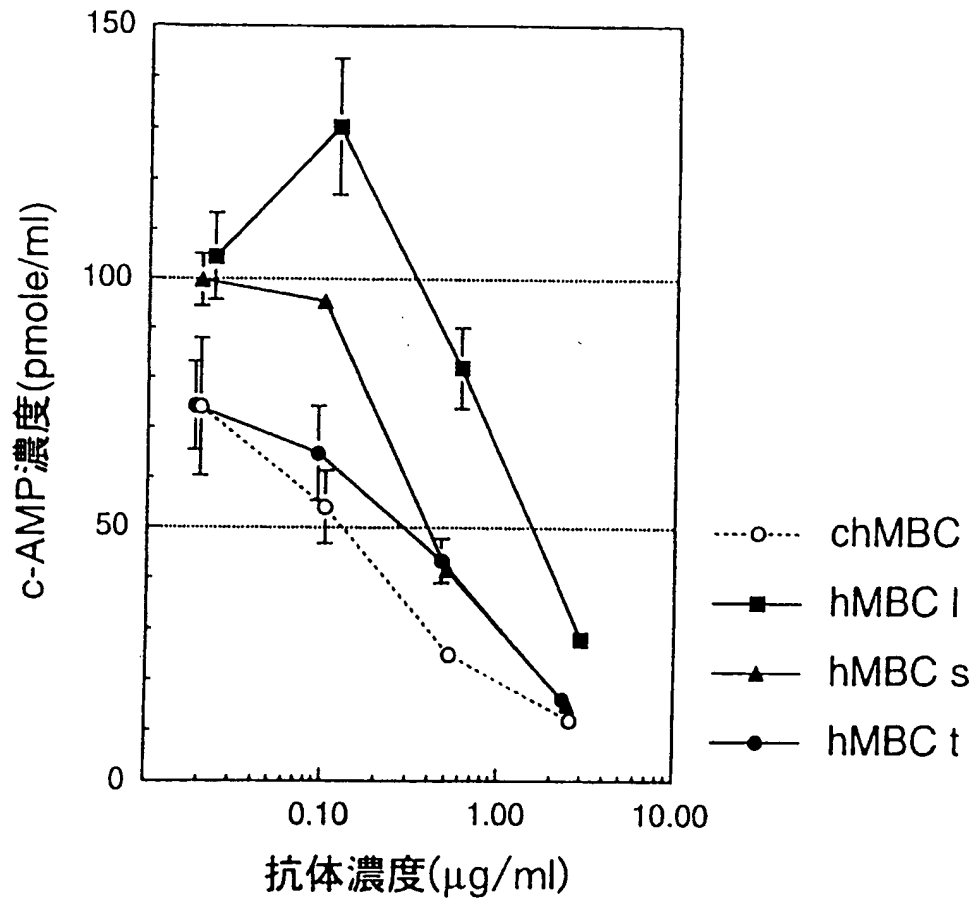


図 1 5

ヒト型化抗PTHrP(1-34)抗体の中和活性

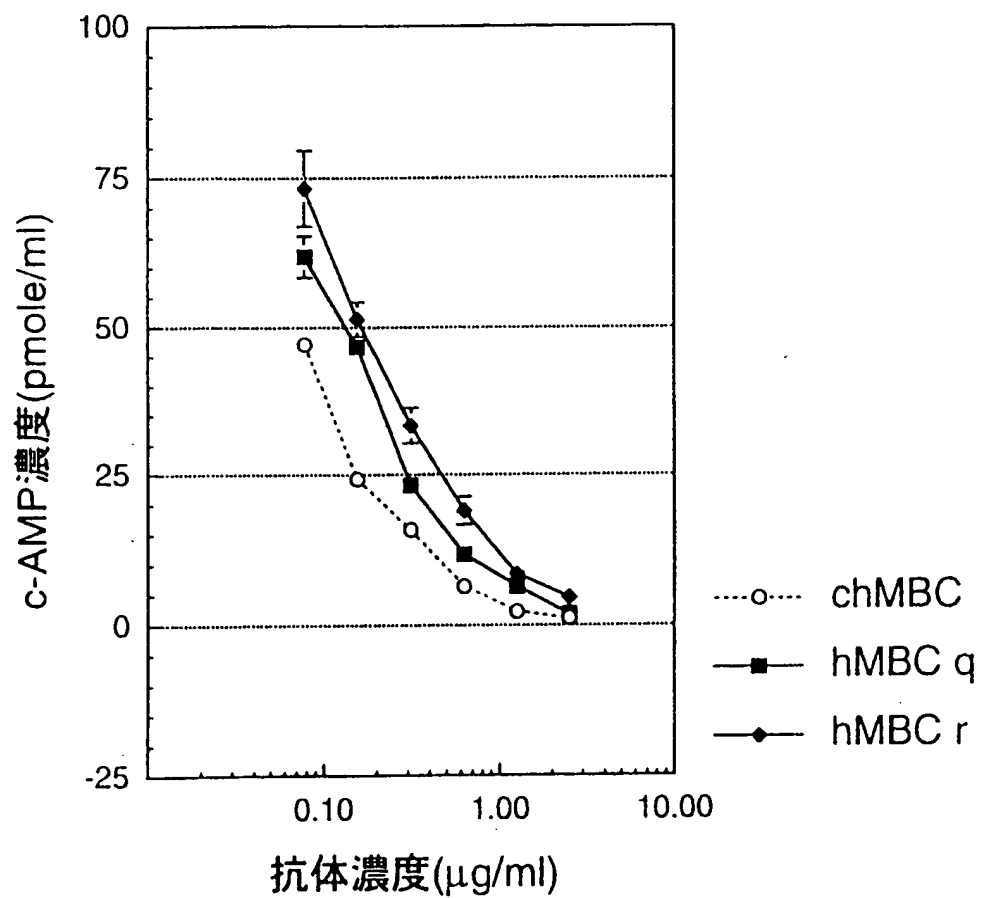


図 16

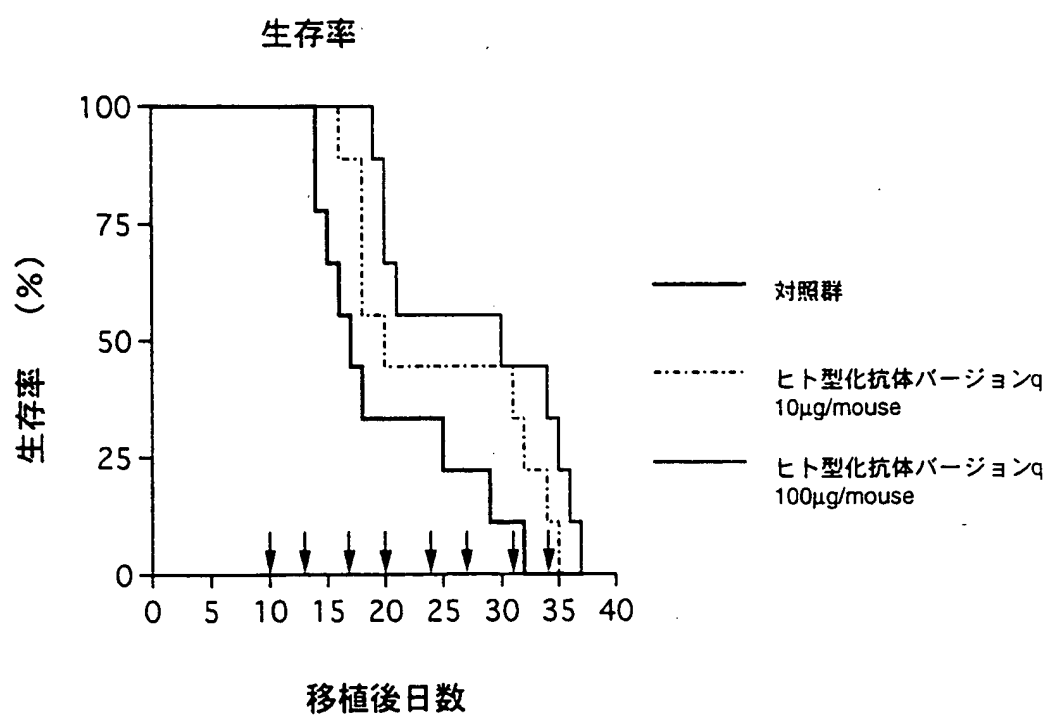


図 17

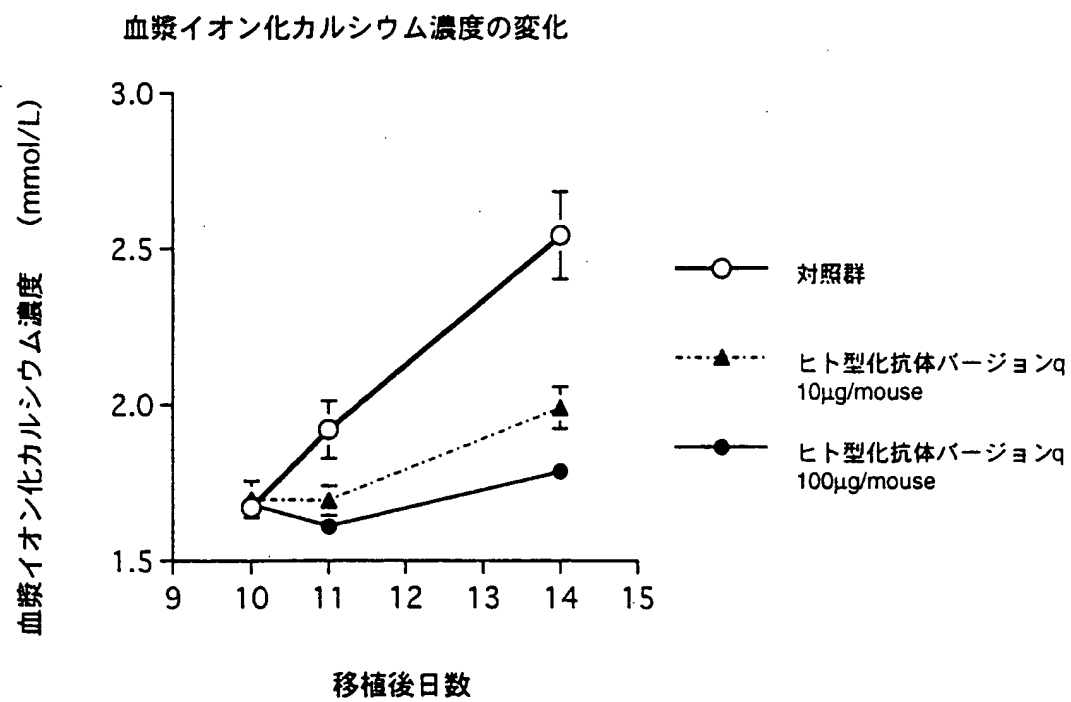


図 18

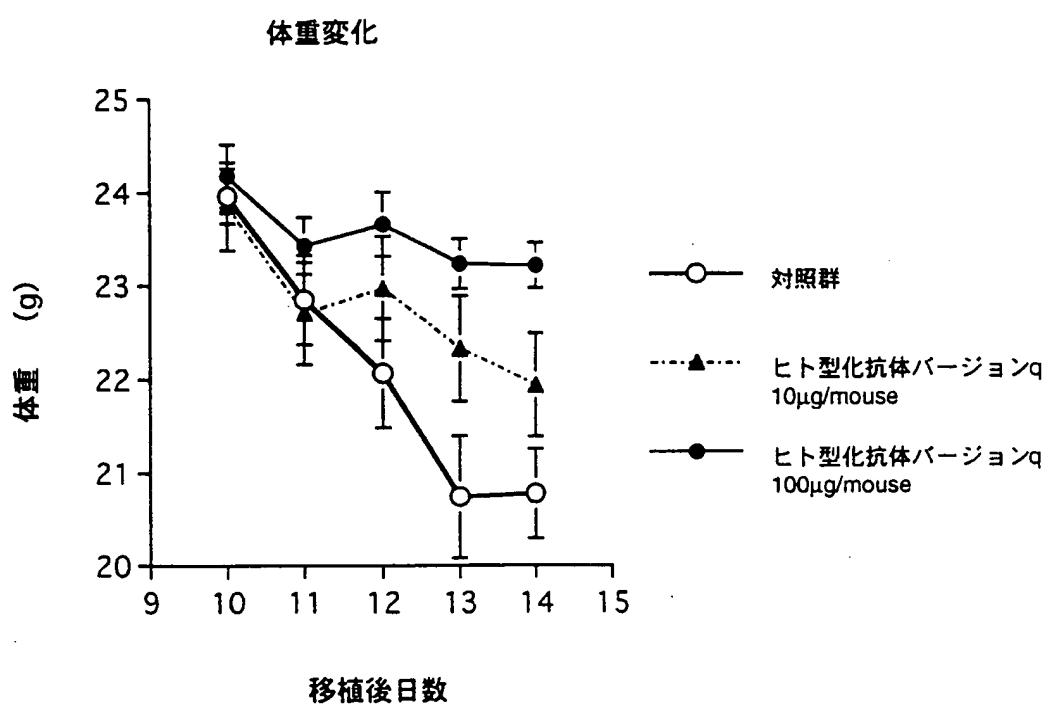
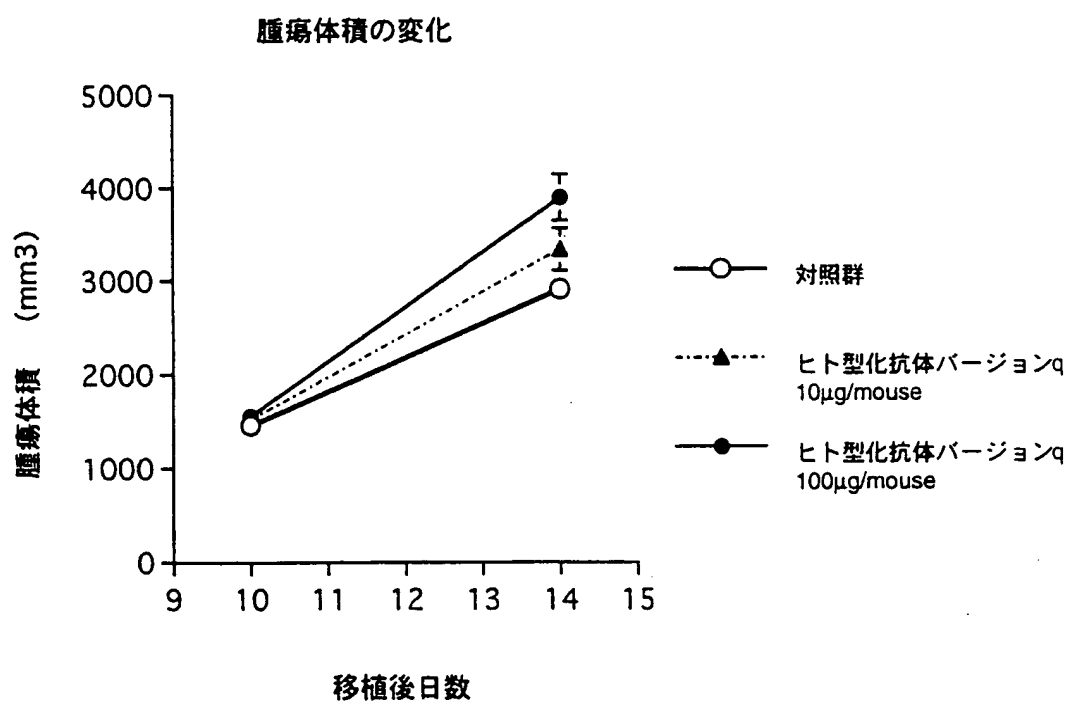




図 19



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02116

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K38/29, 39/395, 45/00 // C12N15/13, C12P21/02, 21/08,  
C07K16/26, 16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K38/29, 39/395, 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO, 96/3437, A1 (Sandoz Ltd.), February 8, 1996 (08. 02. 96) & EP, 773958, A1 & JP, 10-502091, A	1, 2, 8 6
X Y	JP, 63-316800, A (Merck & Co., Inc.) & EP, 293159, A & US, 4771124, A	1, 2, 8 6
X Y	JP, 63-316799, A (Merck & Co., Inc.) & EP, 293130, A	1, 2, 8 6
X Y	JP, 5-509098, A (The Regents of the University of California), December 16, 1993 (16. 12. 93) & WO, 92/753, A & EP, 539491, A1	1, 2, 8 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
August 5, 1998 (05. 08. 98)

Date of mailing of the international search report  
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02116

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Chemical Abstracts, Vol. 120 (1994) Abstract No. 321038 (Sato Kanji, "Passive immunization with anti-parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody markedly prolongs survival time of hypercalcemic nude mice bearing transplanted human PTHrP-producing tumors", J. Bone Miner. Res., Vol. 8, No. 7 (1993) P,849-860)	1, 3, 4, 7, 8 6 5
X Y A	US, 5217896, A (Oncogene Science, Inc.), June 8, 1993 (08. 06. 93) (Family: none)	1, 3, 4, 7, 8 6 5
Y A	Rie Tanaka, "Triple Paraneoplastic Syndrome of Hypercalcemia, Leukocytosis and Cachexia in Two Human Tumor Xerografts in Nude Mice", Japanese Journal of Clinical Oncology, Vol. 26, No. 2 (1996) P.88-94	1-4, 6-8 5
Y	JP, 4-228089, A (Kaneka Corp.), August 18, 1992 (18. 08. 92) (Family: none)	6

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K38/29, 39/395, 45/00//C12N15/13, C12P21/02, 21/08, C07K16/26, 16/28

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K38/29, 39/395, 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 96/3437, A1 (サンド・リミテッド) 8. 2月. 1996 (08. 02. 96) & EP, 773958, A1 & JP, 10-502091, A	1, 2, 8 6
X Y	JP, 63-316800, A (メルク エンド カムパニー インコーポレイテッド) & EP, 293159, A & US, 4771124, A	1, 2, 8 6
X Y	JP, 63-316799, A (メルク エンド カムパニー インコーポレイテッド) & EP, 293130, A	1, 2, 8 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 08. 98

国際調査報告の発送日

18.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C

9051

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 5-509098, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユ ニバーシティー オブ カリフォルニア) 16. 12月. 1993 (16. 12. 93) & WO, 92/753, A & EP, 539491, A1	1, 2, 8 6
X Y A	Chemical Abstracts, Vol. 120 (19 94) Abstract No. 321038 (Sato Kan ji, "Passive immunization with anti-parathyroid hormone-relat ed protein monoclonal antibody markedly prolongs survival ti me of hypercalcemic nude mice bearing transplanted human PTH rP-producing tumors", J. Bone M iner. Res., Vol. 8, No. 7 (1993) P. 8 49-860)	1,3,4,7,8 6 5
X Y A	US, 5217896, A (Oncogene Scienc e, Inc.) 8. 6月. 1993 (08. 06. 93) (ファ ミリーなし)	1,3,4,7,8 6 5
Y A	Rie Tanaka, "Triple Paraneopla stic Syndrome of Hypercalcemi a, Leukocytosis and Cachexia in Two Human Tumor Xerografts in Nude Mice", Japanese Journal of Clinical Oncology, Vol. 26, No. 2 (1996) P. 88-94	1-4,6-8 5
Y	JP, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社) 18. 8 月. 1992 (18. 08. 92) (ファミリーなし)	6